



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA  
BARCELONATECH

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona

# ESTUDI DEL CREIXEMENT EN SUPERFÍCIE DE LA MACROALGA *ULVA* *OHNOI* EN UN FOTOBIORREACTOR

---

Treball de Final de Grau

-

Enginyeria de Sistemes Biològics

Autora: **Nicole Lima Fermin**

Tutors: Ingrid Masaló Llorca

Joan Oca Barabad

Castelldefels, 20 de Juliol de 2020

## RESUM

El creixement de la població global genera una demanda creixent d'aliments i productes provinents de la terra. La necessitat de productes agrícoles, aplica una alta pressió sobre els ecosistemes terrestres i aquàtics, provocant danys irreversibles. La producció de macroalgues, en conjunt amb la poca necessitat d'energia i aigua per la seva producció i els seus elevats valors nutricionals, fan que siguin un bon candidat, principalment, per a la nutrició humana, a més d'altres usos farmacèutics, cosmètics, ramaders i en la indústria dels biocombustibles.

Tenint en compte els usos diversos de les macroalgues en la indústria, l'objectiu d'aquest projecte ha estat avaluar el creixement en superfície de la macroalga *Ulva ohnoi* mitjançant un fotobioreactor. Per tal d'assolir aquest objectiu s'han fet créixer fragments d'alga a un fotobioreactor, el qual permetia mantenir les condicions ambientals idònies pel creixement de les algues, el valor de la superfície dels fragments es va obtenir mitjançant el tractament d'imatges de les mostres.

Els resultats van mostrar una taxa de creixement màxima de  $0.14 \text{ d}^{-1}$  corresponent a l'últim període del primer cultiu (14-21 dies), aquesta taxa de creixement en comparació amb estudis previs és considerablement baixa, fet que es pot atribuir a elevats valors de pH dins del fotobioreactor que no permetien a les algues fixar carboni. En el segon i tercer cultiu es van obtenir taxes de creixement màximes de l'ordre de  $0.06 \text{ d}^{-1}$  i  $0.05 \text{ d}^{-1}$ , respectivament. En tots dos casos es va produir una mort cel·lular del cultiu, produïda per la combinació d'una alta irradiància i una alta temperatura, que van portar al cultiu a un estat de fotoinhibició i que a més van provocar una pèrdua de la concentració de clorofil·la inicial en els fragments d'alga del 20% en el cas del segon cultiu i del 30% en el cas del tercer cultiu. En aquest estudi no s'han obtingut resultats significatius de creixement que aportin evidències suficients per poder entendre el comportament i l'evolució del creixement dels fragments en els cultius, ja que per això hagués estat necessari la realització de més cultius.

**Paraules clau:** *Ulva ohnoi*, fotobiorreactor, IMTA, SGR, superfície, irradiància.

## RESUMEN

El crecimiento de la población global genera una demanda creciente de alimentos y productos provenientes de la tierra. La necesidad de productos agrícolas, aplica una alta presión sobre los ecosistemas terrestres y acuáticos, provocando daños irreversibles. La producción de macroalgas, en conjunto con la poca necesidad de energía y agua para su producción y sus elevados valores nutricionales, hacen que sean un buen candidato, principalmente, para la nutrición humana, además de otros usos como son los farmacéuticos, cosméticos, ganaderos y en la industria de los biocombustibles.

Teniendo en cuenta los usos diversos de las macroalgas en la industria, el objetivo de este proyecto ha sido evaluar el crecimiento en superficie de la macroalga *Ulva Ohnoi* mediante un fotobiorreactor. Para alcanzar este objetivo se han hecho crecer fragmentos de alga en un fotobiorreactor, el cual permitía mantener las condiciones ambientales idóneas para el crecimiento de las algas, el valor de la superficie de los fragmentos se obtuvo mediante el tratamiento de imágenes de las muestras.

Los resultados mostraron una tasa de crecimiento máxima de  $0.14 \text{ d}^{-1}$ , correspondiente al último periodo del primer cultivo (14-21 días), esta tasa de crecimiento en comparación con estudios previos es considerablemente baja, lo que puede atribuirse a elevados valores de pH dentro del fotobiorreactor, que en consecuencia no permitían a las algas fijar carbono. En el segundo y tercer cultivo se obtuvieron tasas de crecimiento máximas del orden de  $0.06 \text{ d}^{-1}$  y  $0.05 \text{ d}^{-1}$ , respectivamente. En ambos casos se produjo una muerte celular del cultivo, producida por la combinación de una alta irradiación y una alta temperatura, que llevaron al cultivo a un estado de fotoinhibición y que además provocaron una pérdida de la concentración de clorofila inicial en los fragmentos de alga del 20% en el caso del segundo cultivo y del 30% en el caso del tercer cultivo. En este estudio no se han obtenido resultados significativos de crecimiento que aporten evidencias suficientes para poder entender el comportamiento y la evolución del crecimiento de los fragmentos en los cultivos, ya que para ello hubiera sido necesario la realización de más cultivos.

**Palabras claves:** *Ulva ohnoi*, fotobiorreactor, IMTA, SGR, superficie, irradiación.

## ABSTRACT

The growth of the global population generates an increasing demand for food and products from the earth. The need for agricultural products applies high pressure to terrestrial and aquatic ecosystems, causing irreversible damage. The production of macroalgae, together with the low need for energy and water for their production and their high nutritional values, make them a good candidate, mainly for human nutrition, in addition to other uses such as pharmaceuticals, cosmetics, livestock breeders and in the biofuel industry.

Taking into account the diverse uses of macroalgae in industry, the objective of this project has been to assess the surface growth of *Ulva Ohnoi* macroalgae using a photobioreactor. To achieve this goal, fragments of algae have been grown in a photobioreactor, which allowed maintaining the ideal environmental conditions for the growth of algae; the value of the surface of the fragments was obtained by image processing of the samples.

The results showed a maximum growth rate of  $0.14\text{ d}^{-1}$ , corresponding to the last period of the first culture (14-21 days). This growth rate compared to previous studies is considerably low, which can be attributed to high pH values inside the photobioreactor, which consequently did not allow algae to fix carbon. In the second and third cultures, maximum growth rates of the order of  $0.06\text{ d}^{-1}$  and  $0.05\text{ d}^{-1}$ , were respectively obtained. In both cases, there was a cell death of the culture, produced by the combination of high irradiation and high temperature. This fact brought the culture into a state of photoinhibition that as consequence caused a loss of the initial concentration of chlorophyll in the algae fragments of the 20% in the case of the second culture and 30% in the case of the third culture. In this study, no significant growth results have been obtained that provide sufficient evidence to understand the behaviour and evolution of the growth of fragments, since this would have required more cultures to be done.

**Keywords:** *Ulva ohnoi*, photobioreactor, IMTA, SGR, surface, irradiation.

# ÍNDIX

ÍNDIX DE FIGURES .....	5
ÍNDIX DE TAULES .....	7
AGRAÏMENTS.....	8
1. INTRODUCCIÓ .....	9
1.1. Les macroalgues .....	9
1.1.1. Classificació de les macroalgues .....	9
1.1.2. Aplicacions de les macroalgues .....	10
1.2. Sistemes de producció d'algues.....	11
1.2.1. Cultiu de macroalgues.....	11
1.2.2. Cultiu de microalgues .....	13
1.3. <i>Ulva ohnoi</i> .....	14
1.3.1. Reproducció i cicle de vida.....	14
1.3.2. Paràmetres que afecten el creixement d' <i>Ulva ohnoi</i> .....	15
1.4. Sistema IMTA .....	16
1.4.1. Cultiu d' <i>Ulva ohnoi</i> en sistema IMTA-RAS.....	17
2. OBJECTIUS .....	18
3. MATERIAL I MÈTODES.....	19
3.1. Característiques de la instal·lació .....	19
3.2. Fotobiorreactor emprat.....	20
3.3. Experiment realitzat.....	22
3.4. Obtenció de fragments pel cultiu .....	22
3.5. Condicions de cultiu .....	23
3.6. Anàlisi de dades .....	24
3.6.1. Anàlisi dades Image J .....	24
3.6.2. SGR (Specific Growth Rate) .....	25
3.6.3. Avaluació aleatorietat dels mostrejos.....	25
3.7. Determinació de clorofil·la .....	25
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ .....	27
4.1. Primer cultiu.....	27
4.2. Segon cultiu.....	30
4.3. Tercer cultiu.....	33
4.4. Determinació clorofil·les .....	35
4.5. Avaluació aleatorietat dels mostrejos.....	37
5. CONCLUSIONS .....	43
6. PERSPECTIVA PER FUTURS ESTUDIS.....	44
7. BIBLIOGRAFIA.....	45
ANNEXOS .....	48

# ÍNDIX DE FIGURES

Fig 1. Alga bruna <i>Dictyota dichotoma</i> (Brattenborg, 2016).....	9
Fig 2 Alga vermella <i>Phycodrys Rubens</i> (Siverside, 2016). ....	10
Fig 3 Exemplar silvestre d' <i>Ulva ohnoi</i> (San Fernando, Cádiz) (Curra Feijoó, 2017). ..	10
Fig 4 Cultiu de <i>Eucheuma</i> i <i>Kappaphycus</i> a Filipines.....	12
Fig 5 Càmera de producció de gametòfits de <i>Saccharina latissima</i> ("kombu de sucre") a la Planta de Cultiu d'algues del IEO a Santander i cultiu a mar en aigües gallegues dels esporòfits produïts (APROMAR, 2014). ....	12
Fig 6 Cultiu en planta en bosses i tancs de distintes espècies de <i>Gracilaria</i> en la Planta de Cultiu d'algues del IEO a Santander produïts (APROMAR, 2014). ....	12
Fig 7 Marge del tal·lus amb dents marginals microscòpiques. ....	14
Fig 8 Cicle de vida isomòrfic d' <i>Ulva</i> . Els tipus d'aparellament (mt) s'indiquen amb (+) i (-). Les fletxes puntejades mostren el desenvolupament patogenètic de gametòfits derivats de gàmetes no utilitzades (Wichard, 2015). ....	14
Fig 9 Cicle biològic d' <i>Ulva</i> (Cremades et al., 2002). ....	15
Fig 10 Esquema aquicultura integrada multitròfica (IMTA) (Chopin et al., 2001) .....	17
Fig 11 Instal·lacions sistema IMTA ESAB, d'esquerra a dreta trobem tanc de llenguados ( <i>Solea senegalensis</i> ), biofiltre i tanc d'algues ( <i>Ulva ohnoi</i> ) (Fotografies realitzades per Nicole Lima Fermin, ESAB, UPC, 2020) .....	19
Fig 12 Representació gràfica de la distribució espacial del sistema IMTA utilitzat en el projecte, situat a l'ESAB (UPC). (Representació realitzada per Nicole Lima Fermin, ESAB, UPC, 2020) .....	21
Fig 13 Algues una vegada tallades. (Fotografia realitzades per Nicole Lima Fermin, ESAB, UPC, 2020). ....	22
Fig 14 Estri utilitzat per tallar algues. (Fotografia realitzades per Nicole Lima Fermin, ESAB, UPC, 2020). ....	22
Fig 15 Esquema moviment d'algues dins del fotobiorreactor. (Representació realitzada per Nicole Lima Fermin, ESAB, UPC, 2020) .....	20
Fig 16 Fotobiorreactor utilitzat. (Fotografia realitzada per Nicole Lima Fermin, ESAB, UPC).....	20
Fig 17 A) Sonda de pH Handy pH meter marca Oxyguard. B) Sonda d'oxigen Handy Polaris marca Oxyguard (OxyGuard International A/S) .....	23
Fig 18 Full-spectrum Quantum Sensor marca Apogee ( Apogee Instruments).....	24
Fig 19 A) El MC-100 Chlorophyll Concentration Meter B) Exemple de determinació del CCI amb una planta terrestre (Imatges obtingudes del manual d'usuari del MC-100) .	26

Fig 20 Fotografies corresponents als mostrejos realitzats durant el primer cultiu. Entre cada mostreig hi ha una diferència de 7 dies. A) Fotografia realitzada dia 0 B) Fotografia realitzada dia 7 C) Fotografia realitzada dia 14 D) Fotografia realitzada dia 21. (Fotografies realitzades per Nicole Lima Fermin, ESAB, UPC, 2020) .....	27
Fig 21 Evolució àrees mitjanes en funció del temps en el primer cultiu, les barres d'error representen la desviació estàndard. ....	28
Fig 22 Fotografies corresponents als mostrejos realitzats durant el segon cultiu. Entre cada mostreig hi ha una diferència de 7 dies. A) Fotografia realitzada dia 0 B) Fotografia realitzada dia 7 C) Fotografia realitzada dia 14. (Fotografies realitzades per Nicole Lima Fermin, ESAB, UPC, 2020).....	30
Fig 23 Evolució àrees mitjanes en funció del temps en el segon cultiu, les barres d'error representen la desviació estàndard. ....	31
Fig 24 Fotografies corresponents als mostrejos realitzats durant el tercer cultiu. Entre cada mostreig hi ha una diferència de 7 dies. A) Fotografia realitzada dia 0 B) Fotografia realitzada dia (Fotografies realitzades per Nicole Lima Fermin, ESAB, UPC, 2020) ...	33
Fig 25 Fotobiorreactor amb les llums dirigides cap enfora del cultiu i amb cartolina reflectant al voltant. A) Fotobiorreactor llums apagades B) Fotobiorreactor llums enceses i C) Cartolina reflectant utilitzada. (Fotografies realitzades per Nicole Lima Fermin, ESAB, UPC, 2020) .....	34
Fig 26 Gràfica de probabilitat i histograma corresponents als valors de les àrees obtingudes al primer cultiu, al primer mostreig 21/02/2020 (0 dies) i segon mostreig 28/02/2020 (7 dies).....	38
Fig 27 Gràfica de probabilitat i histograma corresponents als valors de les àrees obtingudes al primer cultiu, al tercer mostreig 06/03/2020 (14 dies) i quart mostreig 14/03/2020 (21 dies).....	39
Fig 28 Gràfica de probabilitat i histograma corresponents als valors de les àrees obtingudes al segon cultiu, al primer mostreig 15/06/2020 (0 dies).....	40
Fig 29 Gràfica de probabilitat i histograma corresponents als valors de les àrees obtingudes en el segon cultiu, al segon mostreig 22/06/2020 (7 dies) i tercer mostreig 29/06/2020 (14 dies).....	41
Fig 30 Gràfica de probabilitat i histograma corresponents als valors de les àrees obtingudes en el tercer cultiu, al primer mostreig 29/06/2020 (0 dies) i segon mostreig 06/07/2020 (7 dies).....	42

# ÍNDIX DE TAULES

Taula 1 Valors de paràmetres ambientals al fotobiorreactor, expressats com la mitjana $\pm$ desviació estàndard. ....	23
Taula 2 Resultats àrees mitjanes en funció del temps del primer cultiu, amb la respectiva desviació estàndard i variància, i el SGR (o taxa de creixement) obtinguts en cada mostreig. ....	28
Taula 3 Resultats àrees mitjanes en funció del temps del segon cultiu, amb la respectiva desviació estàndard i variància, i el SGR (o taxa de creixement) obtinguts en cada mostreig. ....	31
Taula 4 Resultats àrees mitjanes en funció del temps del tercer cultiu, amb la respectiva desviació estàndard i variància, i el SGR (o taxa de creixement) obtinguts en cada mostreig. ....	34
Taula 5 Valors irradiància ( $\mu\text{mols}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) al cultiu en funció de la direcció de les llums LED. ....	35
Taula 6 Resultats determinació concentració de clorofil·les ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ) , corresponents al segon i tercer cultiu, i a les algues del tanc N2. Els resultats es troben expressats com la mitjana d'aquestes mesures, amb la respectiva desviació estàndard i variància. ....	36
Taula 7 Valors p, test de normalitat ( $\alpha=0.05$ ) en cada cultiu i mostreig. ....	37



## **AGRAÏMENTS**

A la meua família, per recolzar-me en tot moment i animar-me per seguir endavant; a Ingrid Masaló i Joan Oca per la dedicació i ajuda aportada per realitzar aquest treball; a Josep Bringué per tota l'ajuda i consells donats al laboratori.

# 1. INTRODUCCIÓ

El creixement global de la població, combinat amb la millora dels nivells de vida i la longevitat de la població, generen una demanda creixent d'aliments i productes provinents de la terra. D'acord amb l'agenda 2030 per un desenvolupament sostenible (ONU, 2015), s'especifica com a segon objectiu posar fi a la fam al món, aconseguir una seguretat alimentària, la millora de la nutrició i promoure una agricultura sostenible. S'especifica que el sector alimentari i el sector agrícola ofereixen solucions per al desenvolupament i són vitals per l'eliminació de la fam i la pobresa. Gestionades de manera adequada, l'agricultura, la silvicultura i l'aqüicultura poden subministrar menjar de qualitat a tot el planeta. Per poder arribar a complir aquests objectius es necessita una profunda reforma del sistema agrari i alimentari mundial (ONU, 2015).

La necessitat creixent de productes agrícoles, aplica una alta pressió en els ecosistemes terrestres i aquàtics, provocant així la desforestació global i l'escassetat i contaminació dels recursos hídrics disponibles per al reg, fins al punt d'esdevenir el factor limitant més important per la producció d'aliments en àmplies regions del planeta.

La producció de macroalgues, suposa una font sostenible per la producció de biomassa. S'ha vist que diverses espècies de macroalgues tenen elevats valors nutricionals, incloent-hi proteïnes, hidrats de carboni, greixos, fibra bruta, minerals, aminoàcids essencials i antioxidants (Nunes *et al.*, 2017). Aquesta composició, juntament amb la poca necessitat d'energia i aigua per la seva producció, fan que siguin un bon candidat per a la nutrició humana.

## 1.1. Les macroalgues

Les macroalgues són un grup d'algues pluricel·lulars i macroscòpiques. Són organismes autòtrofs que contenen pigments fotosintètics que els permeten realitzar la fotosíntesi, i es caracteritzen per presentar un cos vegetatiu indiferenciat, motiu pel qual estan inclosos dins del grup tal·lòfits.

### 1.1.1. Classificació de les macroalgues

Segons els pigments que posseeixin els cloroplasts, orgànuls on es realitza la fotosíntesi, les algues marines es poden diferenciar a grans trets en tres grans grups (FAO, 2004):

#### Brunes (*Phaeophyta* o *Phucophyta*)

Aquest grup comprèn aproximadament unes 2000 espècies, totes pluricel·lulars i tal·lòfites. El tal·lus no és molt complex, i té una gran varietat cel·lular. Aquestes algues posseeixen pigments molt diversos: clorofil·la a i c, betacarotens i diverses xantofil·les, que els donen una tonalitat marronosa (Fig 1). Els plastids tenen una doble membrana. La paret cel·lular té dues fraccions: una sòlida més interna amb cel·lulosa i alginats i una externa amb mucilaginosa,



Fig 1. Alga bruna *Dictyota dichotoma* (Brattenborg, 2016)

alginats i fucoidina. Es tracta d'un grup amb gran diversitat morfològica i de creixement divers.

Les algues brunes acostumen a ser grans, amb longituds que varien des dels 2-4 metres fins als 20 metres.

### Vermelles (*Rodophyta*)

Les algues vermelles (Fig 2) són un grup molt divers morfològicament. Existeixen representants unicel·lulars i pluricel·lulars i la seva mida pot variar considerablement entre gèneres. Els cloroplasts de les algues vermelles contenen clorofil·la de tipus a i d, aquesta última només en algunes espècies.

Al seu interior trobem els ficobilisomes, complex en el qual es formen i emmagatzemen les ficobilines, un tipus de polisacàrid. Les ficobilines emmascaren la clorofil·la i per aquest motiu el color vermellós predomina sobre el verd. Les ficobilines permeten absorbir amb major facilitat longituds d'ona de l'espectre de llum que arriba a grans profunditats, el que fa possible localitzar-les en regions profundes. La majoria d'algues vermelles acumulen mucíl·lages en les seves parets cel·lulars, aquests els permeten lligar les cèl·lules i compactar el tal·lus. A partir d'aquests mucíl·lages s'obtenen productes d'interès humà, com l'agar i els carragenats, que s'utilitzen amb molta freqüència com a agent gelificant i emulsionant.



Les algues vermelles acostumen a presentar una mida menor en comparació amb les algues brunes, amb una longitud que va d'uns pocs centímetres a un metre aproximadament.

Fig 2 Alga vermella *Phycodrys rubens* (Silverside, 2016).

### Verdes (*Chlorophyta*)

Les algues verdes (Fig 3), amb unes 10.000 espècies aproximadament, viuen en la seva majoria en aigües continentals. Els seus plastis són portadors de clorofil·la a i b, que són els pigments responsables de la coloració verda, també presenten alguns carotenoides com a pigments auxiliars. La paret cel·lular d'aquestes algues està composta per cel·lulosa i pectina. Les algues són d'una morfologia variable: de forma filamentosa, laminars o discoïdals, o estructures més complexes de tipus sifonal.



Fig 3 Exemplar silvestre d'*Ulva ohnoi* (San Fernando, Cádiz) (Curra Feijóo, 2017).

Les algues verdes són també petites i la seva longitud és semblant a la de les vermelles.

#### 1.1.2. Aplicacions de les macroalgues

La utilització de les algues com a aliment es remunta al segle IV al Japó i al segle VI a la Xina. Avui dia en aquests dos països juntament amb la República de Corea són els majors consumidors d'algues com a aliment. La demanda d'algues pel consum humà durant els últims cinquanta anys ha superat la capacitat de l'oferta procedent de les

reserves naturals (FAO, 2004). Aquesta alta demanda és deguda al seu gran valor nutricional, en diferents compostos orgànics i inorgànics com són: proteïnes, carbohidrats, lípids, minerals i vitamines (Nunes *et al.*, 2017).

A més del seu gran valor nutricional, són demandades per les propietats fisicoquímiques de diferents molècules contingudes en aquestes. Compostos, com són l'agar, l'alginat i el carregenat, s'utilitzen per espessir solucions aquoses, formar gelatines de distint grau de fermesa, formar pel·lícules sobre l'aigua i estabilitzar productes.

Altres usos que es fan de les macroalgues, és en l'àmbit de la ramaderia i l'agricultura, com a additiu als pinsos o com a fertilitzant del sol.

Per altra banda, l'activitat antioxidant, antiinflamatòria i anticancerígena, ha permès a les indústries farmacèutiques i de cosmètica utilitzar les algues com a font natural de gran interès, ja que contenen compostos molt beneficiosos per la salut a més de nombroses activitats biològiques que poden ser utilitzades com a ingredient funcional en moltes aplicacions industrials (Quitral R., 2012).

Altrament, a més dels usos mencionats anteriorment, les macroalgues tenen aplicació en la indústria dels combustibles com a alternativa als combustibles fòssils; l'alt contingut en lípids d'algunes espècies d'algues permeten l'extracció d'oli que mitjançant un procés d'esterificació permeten obtenir biodièsel (Almazan, 2008). A més a més, existeix la possibilitat d'utilitzar algues en el tractament d'aigües, amb l'objectiu de reduir els nivells de nitrats, fosfats i nitrits en les aigües, o per bioremediació, aprofitant la capacitat de les algues per la captació i acumulació de metalls pesants (Romero-Morales *et al.*, 2018).

## 1.2. Sistemes de producció d'algues

El cultiu d'algues o ficocultura produeix aproximadament el 70% de les algues marines utilitzades al món. En la segona meitat del present segle les diferents tècniques de cultiu s'han diversificat extraordinàriament i la seva producció ha augmentat de manera vertiginosa. Les algues en general són bones candidates per ser cultivades degut a les seves característiques intrínseques, principalment per l'absència en elles de marcada diferenciació en teixits, el que comporta una facilitat per la reproducció vegetativa, la mal-leabilitat dels seus cicles reproductius i la variabilitat del seu metabolisme, és a dir, la seva capacitat per produir diverses substàncies o en proporcions molt diferents segons la tècnica de cultiu (APROMAR, 2014).

### 1.2.1. Cultiu de macroalgues

Actualment existeixen dos grans grups de cultiu de macroalgues:

#### Cultiu extensiu

És un cultiu de sosteniment basat en la tècnica de semicultiu. Gràcies a l'augment de superfícies de fixació, afavoreixen l'extensió de poblacions naturals. Aquest fenomen s'aconsegueix a partir de la disseminació de plàntules, trasplantant tal·lus fèrtils d'un lloc a un altre, etc.

#### Cultiu intensiu

Es tracta d'un cultiu complex el procés del qual està completament controlat per l'ésser humà. En funció de la situació territorial on es realitzin els cultius de macroalgues, els cultius intensius es poden classificar en tres grans grups:

#### - Ficocultura en mar ("outdoor")

S'utilitza només per espècies que es puguin cultivar mitjançant la propagació vegetativa. Es realitza una fragmentació manual i es fa una sembra dels fragments. Es tracta d'una tècnica poc costosa en materials, com a material només es necessiten principalment cordes i piquetes (Fig 4), per aquest motiu es tracta d'una tècnica molt utilitzada en regions poc desenvolupades. Té rendiments modestos, s'ha de realitzar en zones de poca profunditat, està sotmesa a variacions naturals impredecibles i és susceptible a patologies o pandèmies.



Fig 4 Cultiu de *Euclima* i *Kappaphycus* a Filipines (APROMAR, 2014)

#### - Ficocultura mixta planta-mar

En aquest cas el desenvolupament i la recol·lecció es realitza al mar per la producció de les "llavors" i el sembrat d'aquestes es realitza a terra. Es tracta del procediment que s'utilitza per a aquelles espècies que no es poden propagar de manera vegetativa i en les que per tant, s'ha de repetir el seu cicle biològic d'alternança entre la generació de reproducció sexual (gametòfit) i asexual (esporòfit). Aquest sistema es podria descriure per tant, com un procés controlat de plàntules en instal·lacions a terra (fase de multiplicació) que són introduïdes al mar pel seu desenvolupament final (fase de producció) (Fig 5).



Fig 5 Càmera de producció de gametòfits de *Saccharina latissima* ("kombu de sucre") a la Planta de Cultiu d'algues del IEO a Santander i cultiu a mar en aigües gallegues dels esporòfits produïts (APROMAR, 2014).

#### - Ficocultura en planta ("indoor")

Es realitza a només a terra. Són sistemes amb un elevat preu, en la gran majoria els processos són mecanitzats i controlats, i en molts casos de baixa productivitat. És utilitzat principalment per processos experimentals. Aquest mètode presenta un gran interès en el camp de la biofiltració d'efluents en sistemes integrats i en la producció de matèries primeres d'alt valor afegit, com són les algues alimentàries o d'interès farmacològic (Fig 6).



Fig 6 Cultiu en planta en bosses i tancs de distintes espècies de *Gracilaria* en la Planta de Cultiu d'algues del IEO a Santander produïts (APROMAR, 2014).



### 1.2.2. Cultiu de microalgues

A part dels sistemes presentats anteriorment, existeixen altres tipus de cultiu per algues utilitzats avui dia, pel cultiu de microalgues amb la possibilitat de ser utilitzats amb macroalgues.

Fins al moment, han aparegut dos mètodes principals per al cultiu de microalgues: 1) Unitats obertes, relativament simples, fàcils de mantenir que els permet competir amb altres mètodes de producció, 2) Bioreactors tancats, més sofisticats per al cultiu d'espècies de microalgues especialitzades en la producció de compostos bioquímics específics ([Suh and Lee, 2003](#)).

#### Sistemes de cultius oberts

Les produccions de microalgues comercials es realitzen principalment en sistemes oberts. Podem trobar aquests sistemes en aigües superficials naturals, estanys, llacs, llacunes i estanys artificials. Els sistemes de producció oberts no necessiten grans inversions i manteniment, i es tracten d'instal·lacions simples, però el seu control és complicat, motiu pel qual aquests sistemes tenen baixos rendiments i eficiència. Aquests sistemes són susceptibles a contaminacions per altres algues o bacteris, per tant és particularment complicat mantenir un monocultiu en un sistema de producció obert. Trobem quatre tipus de sistemes oberts:

- **Balses:** piscines artificials, amb una profunditat limitada i sense manipulació de les condicions ambientals.
- **Piscines inclinades:** piscines artificials amb turbulència natural provocada per la gravetat, però amb una elevada sedimentació de cèl·lules a les parts on la velocitat del flux és menor.
- **Tancs circulars:** tancs de formigó, amb una agitació circular provocada per una pala.
- **Raceways:** canals ovalats, amb poca profunditat en forma de circuit tancat. El medi, normalment s'agita mitjançant pales, hèlixs, injectors d'aire, etc. Per tant existeix una agitació que provoca la circulació del cultiu afavorint el creixement i la productivitat ([Escribano, 2019](#)).

#### Sistemes de cultius tancats

Tenint en compte els problemes relacionats amb els sistemes oberts, especialment pel control dels paràmetres ambientals, han sorgit els sistemes de producció tancats. Aquests sistemes es troben aïllats de l'exterior, el que suposa una reducció de la contaminació, un major control de les condicions de cultiu i en general una major rendibilitat i eficiència ([González Céspedes, 2016](#)).

Podem trobar dos tipus de sistemes tancats: els sistemes tancats interiors i sistemes tancats exteriors, la principal diferència que trobem entre aquests dos sistemes és que els primers reben llum artificial al contrari que els segons que aprofiten la llum solar.

Els fotobiorreactors en espais exteriors, són utilitzats principalment pel cultiu d'algues per la producció de compostos bioquímics específics, els més utilitzats són els tubulars, els panells i les plaques. El principal avantatge d'aquest tipus de fotobiorreactors és que permeten utilitzar la llum solar. Tot i això aquest tipus de fotobiorreactor, encara està

subjecte a les condicions exteriors, variacions estacionals, variacions diürnes en les condicions de llum, la temperatura ambient, entre d'altres.

Els fotobiorreactors en espais interiors, s'utilitzen principalment amb la intenció d'obtenir productes de qualitat per al consum humà, amb el que poder garantir una certa qualitat. Aquests com hem esmentat anteriorment s'il·luminen amb llum artificial, ja sigui amb llums fluorescents, fibra òptica o llum emesa per díodes. Aquests bioreactors permeten el control dels paràmetres ambientals dins del cultiu i els paràmetres de creixement. Aquest sistema s'utilitza especialment per processos experimentals, ja que a gran escala suposen un elevat cost a més de presentar una complicada instal·lació.

### 1.3. *Ulva ohnoi*

*Ulva ohnoi* Hiraoka & Shimada (Ulvales, Chlorophyta). Es tracta d'una espècie amb distribució meridional (aigües càlides i amb alta intensitat lumínica) (Curra Feijó, 2017). Es caracteritza per presentar un tal·lus laminar diatomàtic que pot arribar fins als 20-30 cm d'altura, de color verd clar, fràgil i sovint es divideix més o menys a la part superior. Presenta formes diverses, orbicular, ovada o obovada i en algunes ocasions irregular. El gruix de la làmina varia entre 30-55 µm a la zona apical-mitjana i entre 80-90 µm a la zona basal. La làmina acostuma a presentar marges llisos, sovint poden tenir dents microscòpiques marginals (Fig 7). En visió superficial les cèl·lules són poligonals o quadrangulars amb 1 o 3 pirenoides per cèl·lula. La formació de zoids es produeix a la regió marginal del tal·lus, les àrees fèrtils i vegetatives estan clarament definides, cada tal·lus adjunt produeix i allibera meiòspores i gàmetes masculines o femenines (Hiraoka et al., 2004).

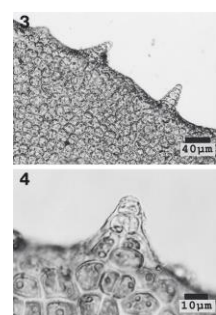


Fig 7 Marge del tal·lus amb dents microscòpiques.

#### 1.3.1. Reproducció i cicle de vida

Totes les espècies d'*Ulva* són isomòrfiques i s'alternen entre etapes de vida gametofítiques i esporòfites amb morfologies similars. Els gametòfits són haploides i els esporòfits són diploides. Els gametòfits produeixen gàmetes haploides biflagel·lades mitjançant mitosi, en canvi, els esporòfits produeixen zoòspores haploides quadriflagel·lades mitjançant meiosis. El desenvolupament tant de gametòfits com d'esporòfits segueixen el mateix patró (Ghaderiardakani et al., 2017) (Fig 8 i Fig 9).

Curiosament, els gametòfits haploides es deriven de zoids haploides d'esporòfits, de gàmetes biflagel·lades sense nom; o de zoids de partenoesporòfits. Les activitats reproductives es produeixen més freqüentment a prop dels marges de les frondes d'*Ulva* o a parts afectades del tal·lus. La gametogènesi/esporogènesi, estan regulades per dos inhibidors de l'esporulació. Les porcions fèrtils del tal·lus són marronoses i es poden reconèixer fàcilment. La gametogènesi/esporogènesi és induïda tan aviat com

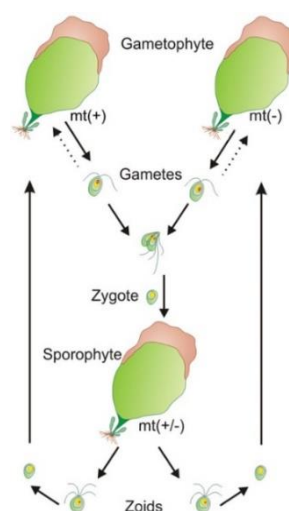


Fig 8 Cicle de vida isomòrfic d'*Ulva*. Els tipus d'aparellament (mt) s'indiquen amb (+) i (-). Les fletxes puntejades mostren el desenvolupament patogenètic de gametòfits derivats de gàmetes no utilitzades (Wichard, 2015).

ambdós inhibidors baixen sota una concentració llindar o ja no es poden percebre. Després de l'eliminació de l'inhibidor, que s'ha estat acumulant al medi durant la gametogènesi, els gàmetes son alliberats al medi (Wichard, 2015).

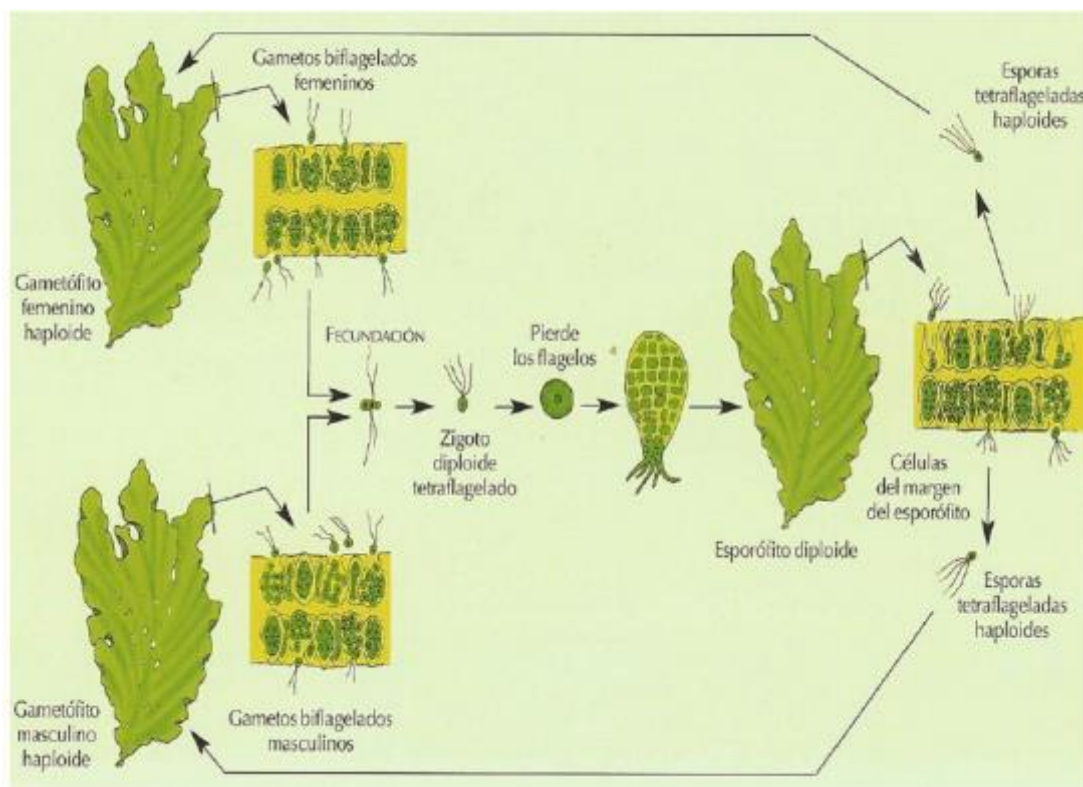


Fig 9 Cicle biològic d'*Ulva* (Cremades et al., 2002).

### 1.3.2. Paràmetres que afecten el creixement d'*Ulva ohnoi*

Els factors abiòtics que més influeixen en el cultiu de macroalgues, i per tant, en el creixement d'*Ulva Ohnoi* són: la irradiància, magnitud que quantifica la radiació incident per unitat de superfície ( $\mu\text{mol}$ s de fotons/ $\text{m}^2 \cdot \text{s}$ ), la disponibilitat de carboni i els nutrients (nitrats, fosfats, nitrats, entre d'altres) a més d'altres paràmetres ambientals com són la temperatura, el pH, la salinitat, la saturació i concentració d' $\text{O}_2$ .

El subministre de llum és essencial per al creixement de les algues, i per tant per al creixement d'*Ulva ohnoi*, ja que es tracta d'una espècie fotosintetitzadora que necessita llum per tal de realitzar la fotosíntesi oxigènica i el metabolisme anabòlic (Casais E., 2016).

La qualitat espectral de la llum és important en el cultiu d'algues. Només la irradiació dins dels 400-700 nm, aproximadament l'espectre de la llum visible, és una radiació fotosintèticament activa, el que anomenem PAR. Si la intensitat lumínica està per sobre del valor crític i arriba al nivell de saturació, el creixement es veurà inhibir per la llum, el que anomenem fotoinhibició. Per altra banda, si la intensitat de la llum està per sota del nivell que és necessari per al manteniment del cultiu, el creixement de l'alga es veurà limitat per la llum, el que anomenem com a fotolimitació (Huang et al., 2017).



El diòxid de carboni (o bicarbonat quan es dissol en el medi de cultiu) és la font de carboni més habitual. És ben sabut que el creixement cel·lular de les algues implica tres processos metabòlics competitiu: fotosíntesi, fotorespiració i respiració fosca. La fotosíntesi fa ús de l'energia lumínica i del CO<sub>2</sub>, com a substrat que a partir de la seva metabolització produeix O<sub>2</sub> i hidrats de carboni (Suh and Lee, 2003).

En el cultiu en tancs o fotobiorreactors, la contínua aeració del cultiu d'algues és molt important i necessària, per tal de mantenir les algues en suspensió, millorar l'eficiència de la utilització de la llum, millorar l'intercanvi de gasos, eliminar l'estratificació tèrmica i ajudar a la distribució de nutrients (Huang *et al.*, 2017). El grau de barreja ja s'ha demostrat que influeix significativament en la productivitat d'algues (Traugott *et al.*, 2020). Quan el flux és massa lent es produeix decantació en el cultiu, l'acumulació d'algues a zones mortes afecta en el deteriorament de l'alga, la descomposició anaeròbia i en la qualitat del producte. Tot i això, s'ha vist que l'agitació mecànica i el trencament de les bombolles sovint condueixen a estrès hidrodinàmic, provocant efectes negatius en el creixement de l'alga i en la seva activitat metabòlica (Bosca, Dauta and Marvalín, 1991).

La disponibilitat de nutrients és un fet important de la productivitat primària d'organismes fotosintètics. A les algues, cultivades en sistemes tancats, se'ls subministren medis amb composicions diferents en forma de CO<sub>2</sub>, aigua, sals minerals en macro- i micro-quantitats. Els macronutrients són considerats com essencials per al creixement normal de les algues, s'hi inclouen: carboni, nitrogen, fòsfor, sofre, calci, magnesi, hidrogen, oxigen, sodi i potassi. Els micronutrients es necessiten en quantitats molt petites (micro-, nano- o inclús pico- grams per litre) (Suh and Lee, 2003).

Un altre factor que afecta en el cultiu d'*Ulva Ohnoi* és la temperatura. La temperatura és un factor principal en les reaccions fotocatalítiques i té un impacte important en l'equilibri químic de les espècies, la solubilitat de gasos, i també del pH. La temperatura òptima per al cultiu d'*Ulva Ohnoi* és generalment entre els 20-25°C (Hiraoka *et al.*, 2004).

Altres paràmetres que poden influir en la taxa de creixement de la *Ulva Ohnoi* són el pH, el rang òptim del qual es troba entre 8-10, l'alcalinitat i la salinitat (Casais, 2016).

## 1.4. Sistema IMTA

L'aquicultura multitròfica integrada (IMTA) es pot definir com l'aquicultura que fa un millor aprofitament dels recursos, retirant el possible excés de matèria orgànica generada pel cultiu aquícola principal mitjançant la incorporació de cultius secundaris; proporcionant per tant una millora del medi ambient, una diversificació d'espècies, i un benefici econòmic afegit per l'empresa productora (Muñoz and Cárdenas, 2011).

En aquests sistemes s'incorporen espècies de diferents nivells tròfics en el mateix sistema els quals estan relacionats i són dependents entre ells.

En els sistemes IMTA cada nivell tròfic té una funció, com si fos un ecosistema. Els nivells tròfics que majoritàriament componen els sistemes IMTA són els següents (Chopin *et al.*, 2001):

- **Peixos:** Aquest nivell tròfic genera residus orgànics i inorgànics, com a resultat de la seva activitat metabòlica o d'aliment que no ha estat ingerit.
- **Filtradors:** Com es veu a la (Fig 10) es troben entre els peixos i les algues. Tenen la funció de filtrar l'aigua i reduir les partícules orgàniques.
- **Algues:** Aquests organismes s'encarreguen de consumir els nutrients dissolts en l'aigua, principalment N i P procedents de l'excreció dels peixos i altres organismes de nivells tròfics superiors, com a conseqüència es produeix un increment de la qualitat de l'aigua.

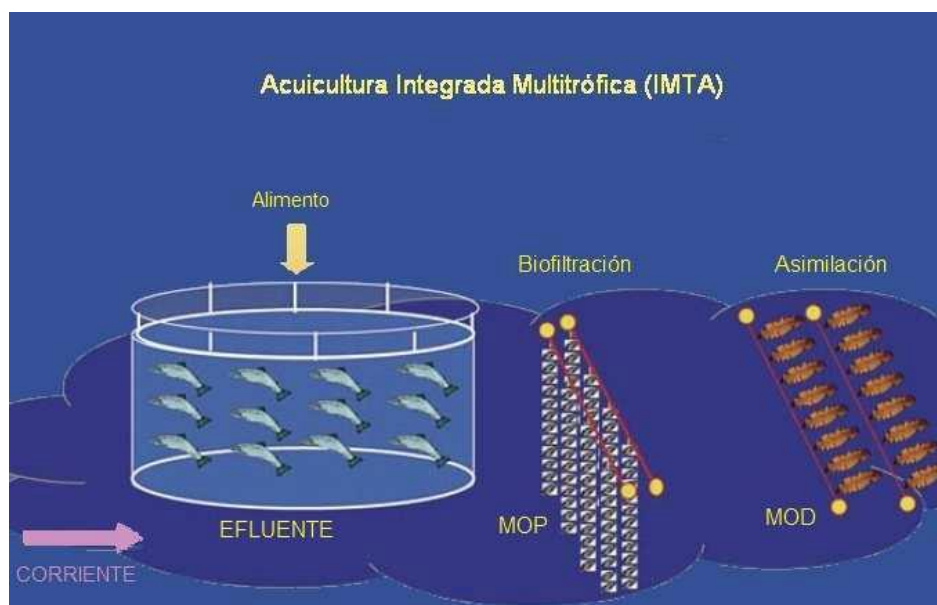


Fig 10 Esquema aqüicultura integrada multitròfica (IMTA) (Chopin et al., 2001)

#### 1.4.1. Cultiu d'*Ulva ohnoi* en sistema IMTA-RAS

En estudis anteriors (Wichard, 2015), s'ha treballat en la producció de diverses macroalgues, entre elles *Ulva ohnoi*, a partir de les espores i els gàmetes alliberades per gametòfits i esporòfits, però donat el cicle de vida de la *Ulva*, aquesta producció es tracta d'un procediment molt complex.

Com s'ha esmentat anteriorment, l'ús de les macroalgues en l'àmbit industrial, representa un ampli ventall. La seva utilització en diferents àmbits fa que es vulgui una mida òptima de l'alga, en funció de l'ús que es vulgui donar al producte, ja sigui per alimentació, per la indústria farmacèutica o altres usos diversos.

La producció de fragments, sota unes condicions ambientals controlades, permet aconseguir un cultiu de fragments de mida uniforme, i per tant això ens permetrà produir fragments d'alga que s'ajustin al que el mercat demana, a més a més, es podrà planificar la producció, per tal de lliurar al client una quantitat d'alga amb una mida específica en una data concreta.

Si aquesta producció s'aconsegueix fer a un cost reduït, poden obrir-se grans oportunitats de comercialització, com és el cas de la gastronomia. Una altra possibilitat seria mantenir els fragments sota unes condicions ambientals adequades per tal de minimitzar el seu creixement i així poder emmagatzemar-los (Bringué, 2019).

## 2. OBJECTIUS

En aquest treball ens hem centrat, en el desenvolupament d'un mètode que ens permeti reproduir la *Ulva* de forma vegetativa a partir de petits fragments, mitjançant fotobiorreactors, els quals permeten mantenir unes condicions ambientals totalment controlades.

Els objectius principals d'aquest projecte són:

- Desenvolupament d'un sistema de cultiu de teixits per la macroalga *Ulva ohnoi* mitjançant un fotobiorreactor.
- Avaluació del creixement en superfície de l'alga *Ulva ohnoi* a partir de la taxa de creixement o SGR.
- Valorar els factors que limiten el cultiu d'*Ulva ohnoi* en un fotobiorreactor.

### 3. MATERIAL I MÈTODES

Tal com s'ha descrit als objectius, aquest estudi es basa en el creixement en superfície de l'alga *Ulva ohnoi*.

Per tal d'estudiar aquest creixement s'han fet créixer fragments d'alga a un fotobiorreactor.

#### 3.1. Característiques de la instal·lació

La instal·lació on s'ha dut a terme aquest projecte, es tracta d'un sistema multitròfic integrat (IMTA), ubicat a l'ESAB (Escola Superior d'Agricultura, UPC Castelldefels).

El sistema consisteix en el cultiu simultani de macroalgues (*Ulva ohnoi*) i llenguados (*Solea senegalensis*) (Fig 11).

Les algues utilitzades en l'experiment han estat extretes d'aquestes instal·lacions.



Fig 11 Instal·lacions sistema IMTA ESAB, d'esquerra a dreta trobem tanc de llenguados (*Solea senegalensis*), biofiltre i tanc d'algues (*Ulva ohnoi*) (Fotografies realitzades per Nicole Lima Fermin, ESAB, UPC, 2020)

Aquest sistema està compost per dos tancs cilíndrics on es cultiven els llenguados, un primer tanc on només trobem un llenguado adult i un altre tanc on trobem 28 llenguados juvenils, tots dos tancs tenen un diàmetre d'1 m. Dels cinc tancs on es cultiven algues, tres són tancs cilíndrics de 0.32 m<sup>2</sup> (90 L) i dos són de superfície rectangular i fons semicircular 0.64 m<sup>2</sup> (172 L).

A més a més, dins del sistema trobem un tanc (tanc d'expansió) dins del qual hi ha un biofiltre. Aquest biofiltre té la funció de transformar el nitrogen amoniacal (altament tòxic pels peixos) en nitrats. Altrament per tal de mantenir un pH òptim pel creixement de les algues, trobem un tanc amb una concentració d'àcid clorhídric, del qual surt un cabal constant i continu al tanc d'expansió.

Com s'observa a la Fig 14, dins del sistema trobem un circuit d'aigua, en aquest circuit el tanc d'expansió suposa un punt d'inici, l'aigua del tanc d'expansió proveeix aigua renovada als tancs d'algues i peixos. L'aigua que torna del tanc dels peixos al tanc d'expansió és rica en nitrogen amoniacal, a causa les defecacions dels peixos o de pinso

no consumit. Dins del tanc trobem el biofiltre que, com s'ha esmentat anteriorment, té la funció de transformar l'amoni en nitrats. L'aigua que arriba al tanc de les algues és per tant rica en nitrats, que mitjançant la fotosíntesi és fixat per les algues, d'aquesta manera es redueixen les espècies nitrogenades de l'aigua.

### 3.2. Fotobiorreactor emprat

Per a la realització de l'estudi s'ha utilitzat un fotobiorreactor (Fig 13), cilíndric, amb un diàmetre interior de 14.5 cm i una capacitat de 7.2 L.

En aquest reactor no existeix flux d'entrada ni de sortida d'aigua. Es tracta d'un biorreactor amb un flux d'aeració a la base per tal d'homogeneïtzar el medi. Aquesta aeració permet que les algues pugin ràpidament per la part interior del bioreactor i baixin amb una menor velocitat per les parets d'aquest, rebent d'aquesta manera més irradiació, la Fig 12 il·lustra aquest moviment.

Com es pot observar a la imatge (Fig 13), al voltant del bioreactor trobem enrotllada una tira de leds, que proporcionen llum al cultiu, aquesta tira de leds es troben connectades a una font d'alimentació.

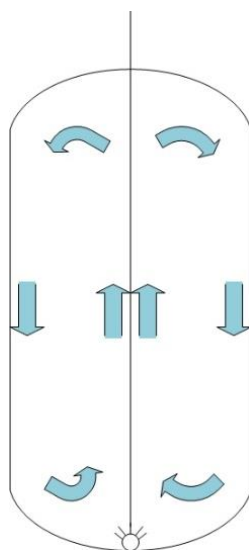


Fig 12 Esquema moviment d'algues dins del fotobiorreactor. (Representació realitzada per Nicole Lima Fermin, ESAB, UPC, 2020)



Fig 13 Fotobiorreactor utilitzat. (Fotografia realitzada per Nicole Lima Fermin, ESAB, UPC).

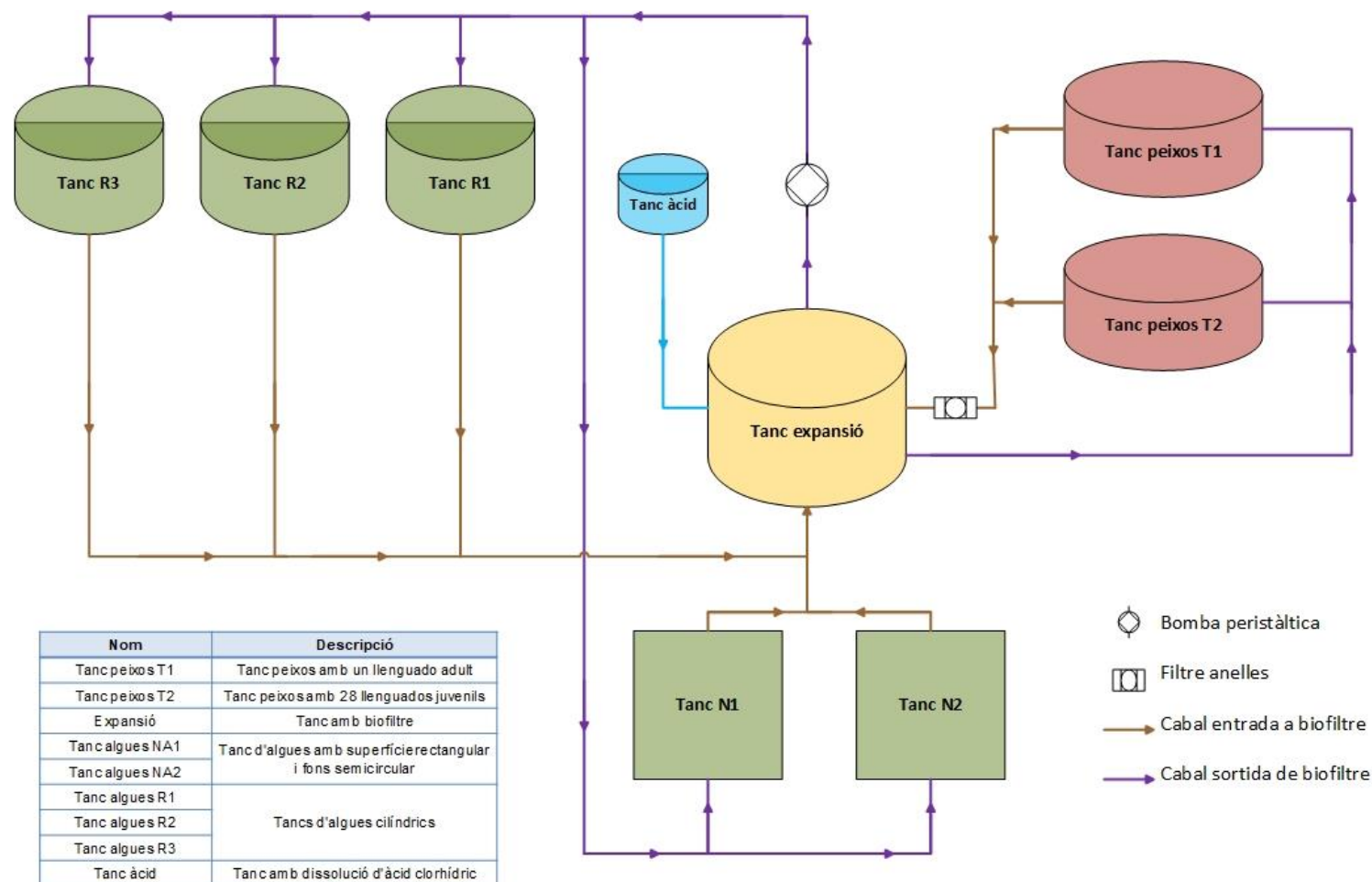


Fig 14 Representació gràfica de la distribució espacial del sistema IMTA utilitzat en el projecte, situat a l'ESAB (UPC). (Representació realitzada per Nicole Lima Fermin, ESAB, UPC, 2020)



### 3.3. Experiment realitzat

Per tal de realitzar l'experiment es va seguir el procediment descrit a continuació.

Cada 7 dies es feia un mostreig, en el qual s'escollien aproximadament 100 fragments d'alga del cultiu, de manera el més aleatori possible. Aquests 100 fragments es van disposar sobre un paper de filtre, procurant que quedessin els més estirats possibles.

Era important que els fragments quedessin estirats, per tal de tenir una mida de l'àrea el més exacte possible.

Una vegada estirats els fragments, aquests eren fotografiats amb un dispositiu mòbil. Aquestes imatges eren tractades amb un programari informàtic (ImageJ) per tal de calcular l'àrea dels fragments, el protocol d'aquest programari es troba descrit a l'Annex A.

Els fragments fotografiats eren tornats al cultiu.

Aprofitant el mostreig dels fragments d'alga, cada setmana es feia un canvi del 90% del volum d'aigua del cultiu per aigua del tanc d'expansió, per tal de fer una renovació de nutrients.

A l'Annex E trobem el diagrama experimental d'aquest experiment.

Durant l'experiment es van realitzar 3 cultius, seguint el mateix procediment esmentat anteriorment.

### 3.4. Obtenció de fragments pel cultiu

Per tal d'obtenir fragments de mida igual i uniforme, es va utilitzar un tallador especial. Aquest tallador es tracta d'un estri de cuina que permet obtenir molts fragments de forma quadrada i de mida uniforme, d'uns 0.25 cm<sup>2</sup> aproximadament. A la Fig 15 es mostra un exemple d'aquest estri.

Per fer els talls d'alga, es disposaven de 7 a 8 fulles d'alga sobreposades a fi de tenir un gruix que permetés fer un tall net, i es pot observar a la Fig 16 s'obtenien fragments molt uniformes.

Amb l'objectiu d'obtenir una màxima homogeneïtat en el cultiu inicial, totes les algues utilitzades per fer els fragments es van extreure del tanc N2, i per consegüent tots els exemplars han crescut en les mateixes condicions abans de ser tallades.



Fig 15 Estri utilitzat per tallar algues.  
(Fotografia realitzades per Nicole Lima Fermin, ESAB, UPC, 2020).

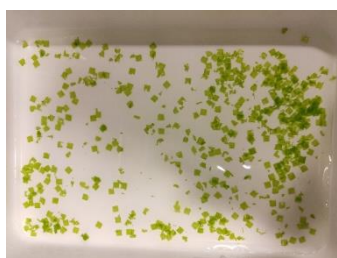


Fig 16 Algues una vegada tallades.  
(Fotografia realitzades per Nicole Lima Fermin, ESAB, UPC, 2020).

Tot seguit, amb l'ajuda d'un salabre, es centrifugaven de manera mecànica els fragments obtinguts i després es pesaven 6 g que s'introduïen al fotobiorreactor, en el cas del tercer cultiu es van introduir 17 g. El fotobiorreactor es va omplir amb 7.2 L d'aigua del tanc d'expansió. Per tant la densitat inicial del cultiu va ser de 0.83 kg/m<sup>3</sup> o de 0.03 kg/m<sup>2</sup> en el cas del primer i segon cultiu, i de 2.34 kg/m<sup>3</sup> o 0.08 kg/m<sup>2</sup>.

### 3.5. Condicions de cultiu

Les condicions de cultiu del fotobiorreactor es troben especificades a la Taula 1.

*Taula 1 Valors de paràmetres ambientals al fotobiorreactor, expressats com la mitjana  $\pm$  desviació estàndard.*

	PRIMER CULTIU		SEGON CULTIU		TERCER CULTIU	
	Llums ON	Llums OFF	Llums ON	Llums OFF	Llums ON	Llums OFF
Temperatura (°C)	24.0 $\pm$ 1.8		26.9 $\pm$ 4.2	24.9 $\pm$ 1.0	29.2 $\pm$ 2.1	26.5 $\pm$ 0.60
[O <sub>2</sub> ] (mg/l)	9.3 $\pm$ 1.6		7.4 $\pm$ 1.8	8.4 $\pm$ 1.1	6.6 $\pm$ 0.1	6.6 $\pm$ 0.4
Saturació O <sub>2</sub> (%)	106 $\pm$ 8.8		103 $\pm$ 0.0	107 $\pm$ 8	103 $\pm$ 2	98 $\pm$ 5
pH	9.16 $\pm$ 0.3		8.26 $\pm$ 0.4	8.08 $\pm$ 0.31	8.19 $\pm$ 0.49	8.41 $\pm$ 0.23
Salinitat (ppt)	34.8 $\pm$ 6.7		36.0 $\pm$ 1.4	36.0 $\pm$ 1.4	40.0 $\pm$ 0.0	40.0 $\pm$ 0.0
Alcalinitat (mg CaCO <sub>3</sub> /l)	107.23 $\pm$ 33.0		121.51 $\pm$ 7.37		132.51 $\pm$ 0.00	
Il·luminació ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )	345 $\pm$ 91		345 $\pm$ 91		345 $\pm$ 91	

Les mesures de la temperatura, la concentració i la saturació d'oxigen, així com el pH, es van realitzar amb sondes (Handy pH i Handy Polaris, marca OxyGuard) (Fig 17).



*Fig 17 A) Sonda de pH Handy pH meter marca Oxyguard. B) Sonda d'oxigen Handy Polaris marca Oxyguard (OxyGuard International A/S)*

Com es pot observar a la Taula 1, la temperatura mitjana al fotobiorreactor ha estat de 24.0  $\pm$  1.8°C en el primer cultiu, de 26.9  $\pm$  4.2°C (amb els llums encesos) en el segon cultiu i de 24.9  $\pm$  1.0°C (amb els llums apagats), de 29.2  $\pm$  2.1°C (llums encesos) i de 26.5  $\pm$  0.6 °C (llums apagats) en el tercer cultiu, sent una temperatura en tots tres casos superior a l'ambient, això és a causa de l'energia calorífica que desprenien els llums LED i que com a conseqüència provocaven una pujada en la temperatura del cultiu.



El pH és un paràmetre important en el creixement de les algues, ja que té un impacte important en l'equilibri químic de les espècies, especialment en l'equilibri químic de les espècies carbonatades. A pH molt bàsics, el carboni es troba en forma de  $\text{CO}_3^{2-}$  (carbonat), aquest fet no és beneficiós per les algues, ja que no poden fixar el carboni en aquesta forma. Per aquest motiu en el cultiu s'havia de mantenir un pH per sota de 9. Per controlar el pH i evitar que aquest pugés, es van anar afegint 30 mL de solució d'àcid clorhídric, només en el cas del primer cultiu, en el qual es van mesurar alts valors de pH. Aquesta solució prové del tanc d'àcid que trobem a les instal·lacions del sistema IMTA.

El control de l'alcalinitat, es va realitzar mitjançant una anàlisi química, el protocol del qual es troba especificat a l'Annex B.

La il·luminació, en aquest cas s'ha mesurat mitjançant un sensor quàntic de la marca Apogee (Fig 18), aquest sensor proporciona una mesura precisa i rendible de la radiació fotosintèticament activa (PAR), en  $\mu\text{mols fotons/m}^2\cdot\text{s}$ , de totes les fonts de llum que s'utilitzen per cultivar plantes i coralls. En aquest cas, i com es pot observar a la figura (Fig 13), la llum del cultiu és emesa per tires de LED que es troben enrotllades al voltant del fotobiorreactor. Com a conseqüència trobem punts del fotobiorreactor als quals es proporcionen flux de llum molt elevats, el que provoca que la distribució de llum dins del bioreactor sigui molt heterogènia, tenint en compte això es va optar per fer diverses mesures al llarg del bioreactor sobre el punt mitjà del seu diàmetre. El flux de llum mitjà en el bioreactor té un valor de  $345 \pm 91 \mu\text{mols}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , però en l'espai que trobem entre les tires de LED el valor mitjà és de  $187 \pm 130 \mu\text{mols}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , en canvi, just sobre la tira de LED el valor mitjà és de  $1052 \pm 144 \mu\text{mols}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , sent significativament diferent.



Fig 18 Full-spectrum Quantum Sensor marca Apogee ( Apogee Instruments)

A més dels paràmetres mencionats anteriorment, es va fer un seguiment de la concentració de nitrats al cultiu, la mesura d'aquesta concentració es va fer seguint el protocol explicat a l'Annex C. La concentració inicial de nitrats al cultiu, correspon a la concentració que hi havia a l'aigua del tanc d'expansió. La concentració de nitrats final del cultiu, correspon a la concentració de nitrats al cultiu passada una setmana. Una vegada realitzat el primer mostreig i feta la renovació d'aigua, es canvia el 90% del volum d'aigua del cultiu per aigua del tanc d'expansió i es deixa el 10% del volum del cultiu. En aquest cas, la concentració inicial de nitrats al cultiu, passa a ser una mitjana ponderada de la concentració de nitrats a l'aigua del tanc d'expansió i la concentració de nitrats final del cultiu aquella setmana.

### 3.6. Anàlisi de dades

#### 3.6.1. Anàlisi dades Image J

Com s'ha esmentat anteriorment, per tal d'obtenir les àrees dels fragments mostrejats, es va fer servir el programari ImageJ per tal de tractar les imatges obtingudes en cada

mostreig. Una vegada tractada la imatge el programa dona com a sortida l'àrea corresponent a cada fragment.

Observant detingudament els cultius d'algues es podia apreciar, que dins dels cultius trobàvem fragments molt petits i fragments molt grans. El que pot haver estat degut al fet que a l'hora de tallar les algues no es tallessin amb la forma exacta, i quedessin trossos junts o restes d'alga, residu de realitzar els talls.

Tenint en compte aquest fet, a l'hora de processar les dades i analitzar-les, es va optar per eliminar un 20% de les àrees més petites i un 20% de les dades més grans.

Per tal d'analitzar aquestes dades, es va calcular l'àrea mitjana de cada mostreig, juntament amb la desviació estàndard i la variància, amb el programari Excel.

### 3.6.2. SGR (Specific Growth Rate)

Amb l'objectiu d'estudiar el creixement dels fragments, es calcula el SGR o taxa de creixement amb l'equació (1), a partir de l'àrea mitjana obtinguda al final i a l'inici del cultiu, i tenint en compte un interval de temps de 7 dies.

$$SGR = \frac{\ln\left(\frac{\text{Àrea final}}{\text{Àrea inicial}}\right)}{\text{Temps}} \quad (1)$$

### 3.6.3. Avaluació aleatorietat dels mostrejos

Amb la finalitat de determinar que els fragments d'alga es van seleccionar de manera aleatòria, es va realitzar un test de normalitat amb l'ajuda del programari estadístic Minitab 18, amb un nivell de significació o  $\alpha$  de 0.05.

Els fragments hauran estat seleccionats de manera aleatòria si la mostra de fragments escollits segueixen una distribució normal. La hipòtesi nul·la en un test de normalitat estableix que la població és normal. La hipòtesi alternativa afirma que la població no és normal. Per determinar si les dades obtingudes segueixen una distribució normal realitzem un test de normalitat, a partir del qual obtenim una gràfica de probabilitat amb el valor p de la prova i un histograma de les dades.

La gràfica de probabilitat traça els valors de les dades ordenats amb els valors que s'esperen que siguin a prop si la mostra es distribueix normalment, aquesta mostra tindrà una distribució normal quan els punts traçats formin una línia recta.

## 3.7. Determinació de clorofil·la

Durant el segon i el tercer cultiu es va realitzar una determinació de les clorofil·les al principi i al final del cultiu.

Les mesures del contingut de clorofil·la en les algues es van realitzar amb el *MC-100 Chlorophyll Concentration Meter* (Apogee Instruments Inc.) (Fig 19). El mesurador òptic mesura la relació de transmissió de radiació de dues longituds d'ona diferents (635 i 931 nm) i dóna la concentració de clorofil·la com a l'índex de contingut de clorofil·les (CCI),

que és calculat a partir de la mesura de la relació de transmittància ([manual usuari MC-100](#)).

Per fer aquesta determinació es van seleccionar a l'atzar 30 fragments aproximadament de la mostra, i es va realitzar la mesura al final del cultiu, a més a més, es van seleccionar 30 fragments aproximadament del tanc N2, del qual també es va fer la mesura. Per tant, com a concentració inicial de clorofil·la es va considerar la concentració de les algues del tanc N2, tanc d'on provenien les algues abans de ser tallades, i la concentració final es va considerar la concentració de clorofil·la al final de cada cultiu.

Com que els valors que s'obtenen del mesurador òptic són una unitat relativa (un valor numèric sense dimensió relacionat amb el contingut de clorofil·la), s'ha utilitzat la recta de regressió (2) obtinguda en un altre estudi ([Masaló, comunicació personal](#)), amb la qual es pot convertir unitats relatives en contingut de clorofil·la en contingut absolut de clorofil·la en l'alga *Ulva ohnoi*.

$$\text{Total chlorophyll } (\mu\text{mol}/\text{m}^2) = 66.529 \cdot \text{CCI} - 58.185 \quad (2)$$

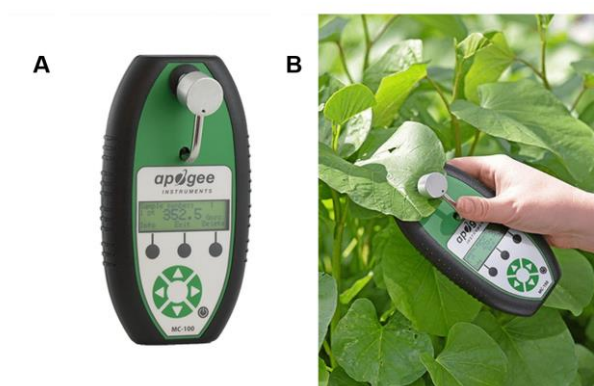


Fig 19 A) El MC-100 Chlorophyll Concentration Meter B) Exemple de determinació del CCI amb una planta terrestre (imatges obtingudes del manual d'usuari del MC-100)

## 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Durant l'experiment s'han realitzat tres cultius, els resultats dels quals es troben especificats a continuació.

A causa de la pandèmia provocada pel virus Covid-19, no s'ha pogut dur a terme el treball experimental tal com es tenia previst, i com a conseqüència no s'han pogut realitzar més cultius, per obtenir resultats més significatius.

### 4.1. Primer cultiu

Al llarg del primer cultiu es van realitzar quatre mostres a partir dels quals es van obtenir 4 fotografies (Fig 20).

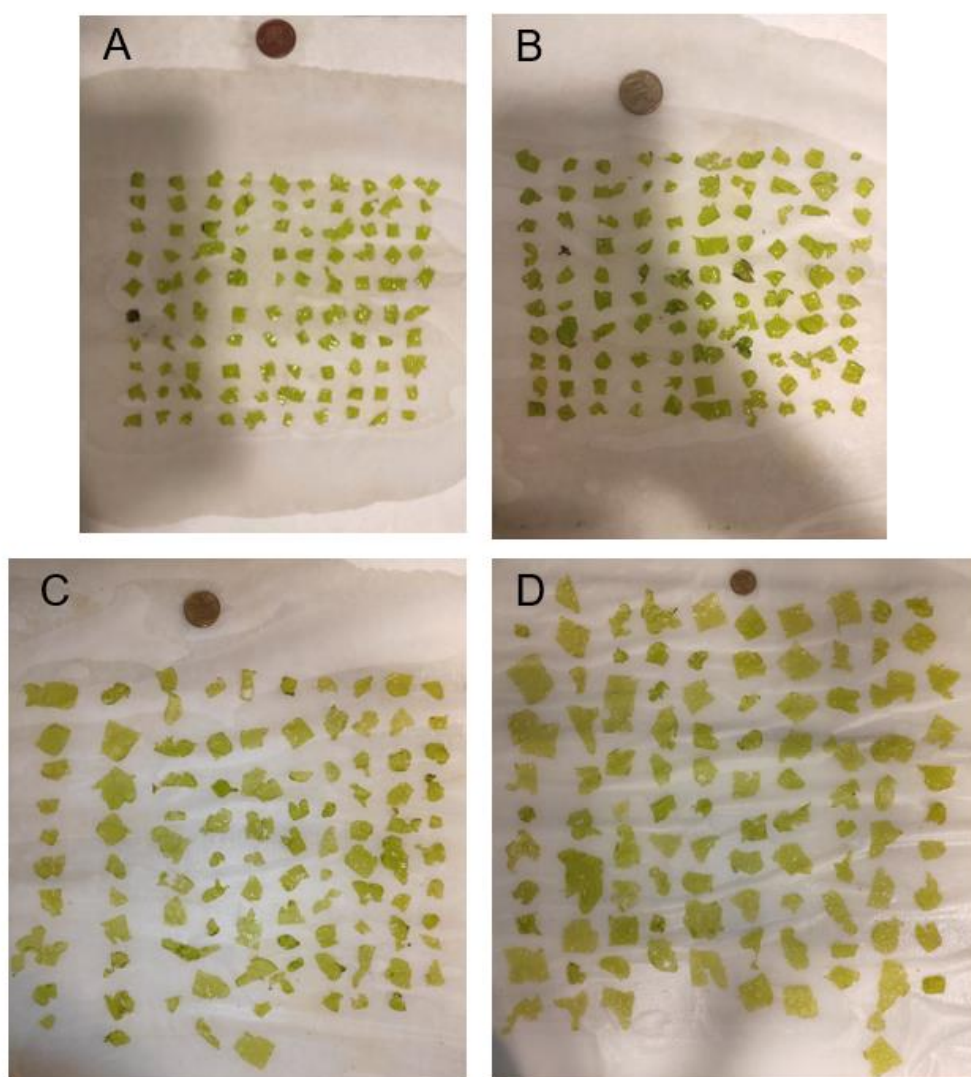


Fig 20 Fotografies corresponents als mostres realitzats durant el primer cultiu. Entre cada mostreig hi ha una diferència de 7 dies. A) Fotografia realitzada dia 0 B) Fotografia realitzada dia 7 C) Fotografia realitzada dia 14 D) Fotografia realitzada dia 21. (Fotografies realitzades per Nicole Lima Fermin, ESAB, UPC, 2020)

Com es pot observar a la Fig 20, concretament a la imatge A, els fragments d'algues inicials tenen una forma quadrada bastant uniforme entre els diferents fragments. A la

imatge D de la Fig 20, es pot observar com passats 21 dies, aquests fragments adquireixen formes irregulars. En anteriors Treballs de Fi de Grau (Bringué, 2019) (Escribano, 2019), realitzats en les mateixes instal·lacions, s'han obtingut resultats semblants, en els quals la forma inicial dels fragments era rodona i al final del cultiu adquirien formes irregulars.

Mitjançant el tractament d'aquestes imatges amb el programari ImageJ, es van obtenir les àrees dels fragments, els resultats d'aquestes àrees es troben especificats a l'annex D.

A la Taula 2 hi trobem una síntesi d'aquests resultats expressats com la mitjana, amb la respectiva desviació estàndard i variància. A partir d'aquesta taula, podem observar que l'àrea mitjana inicial és de  $0.354 \pm 0.056 \text{ cm}^2$  i passats 21 dies l'àrea mitjana és de  $3.877 \pm 0.901 \text{ cm}^2$ .

Taula 2 Resultats àrees mitjanes en funció del temps del primer cultiu, amb la respectiva desviació estàndard i variància, i el SGR (o taxa de creixement) obtinguts en cada mostreig.

Temps (dies)	Àrea mitjana (cm <sup>2</sup> )	Desviació estàndard	Variància	SGR (d <sup>-1</sup> ) <sup>(*)</sup>
0	0.354	0.056	0.003	-
7	0.577	0.121	0.01	0.07
14	1.209	0.327	0.11	0.11
21	3.877	0.901	0.81	0.15

(\*) Fa referència al període de 7 dies.

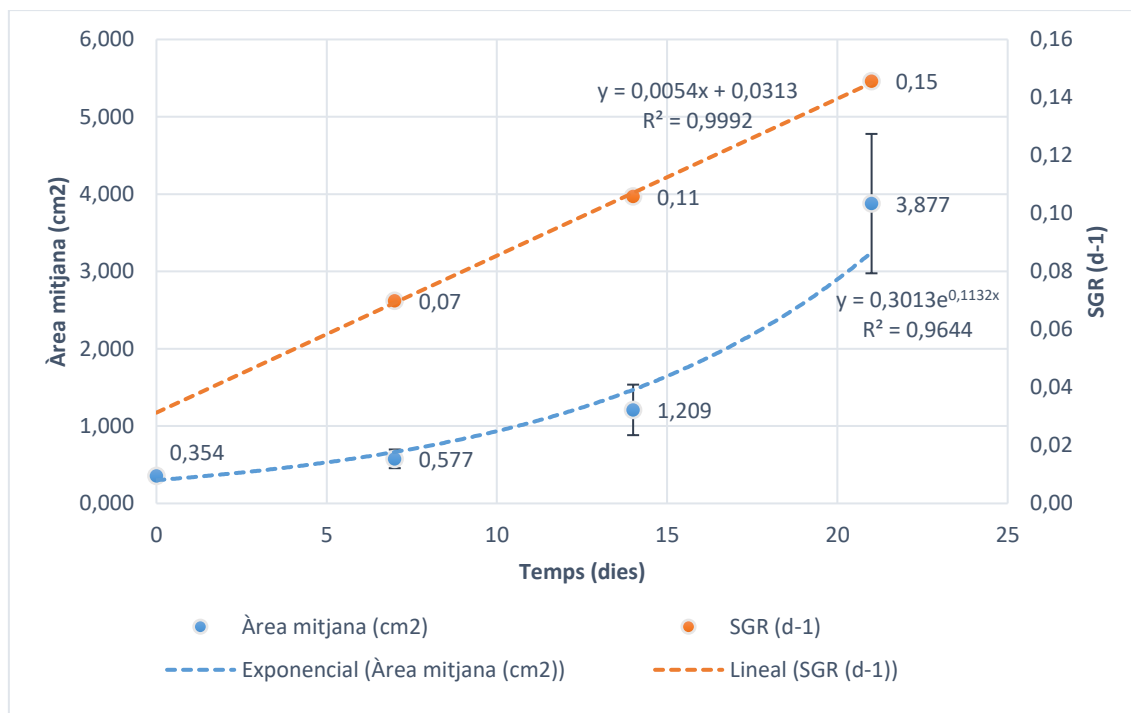


Fig 21 Evolució àrees mitjanes en funció del temps en el primer cultiu, les barres d'error representen la desviació estàndard.

Com podem observar a la Fig 21 l'àrea dels fragments és creixent en funció dels temps, aquesta s'aproxima a un creixement exponencial descrit per l'equació  $y = 0.3013e^{0.1132x}$  amb una  $R^2$  de 0.9644.



Els resultats obtinguts a partir del càlcul de la taxa de creixement específica o SGR, es troben especificats a la Taula 2 i representats a la Fig 21 en funció del temps.

Aquest creixement segueix un comportament lineal, descrit per l'equació  $y = 0.0054x + 0.0313$  amb una  $R^2$  de 0.9992. El fet que la taxa de creixement del cultiu segueixi un creixement lineal suggereix que la irradiància en aquest cas no és un factor limitant, el que indicaria que rep més llum de la necessària, o que fins i tot es troba saturat, el que pot conduir a fotosaturació o fotoinhibició. Com s'ha mencionat anteriorment el cultiu rep de mitjana  $345 \pm 91 \mu\text{mols}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , però tenim punts al fotobiorreactor on la irradiància és molt superior, aquests punts tenen un valor mitjà de  $1052 \pm 144 \mu\text{mols}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Com es pot observar la taxa de creixement més gran, de  $0.15 \text{ d}^{-1}$ , es va obtenir en l'últim període (14 a 21 dies de cultiu). Aquesta taxa de creixement ha estat creixent en funció del temps, el valor mínim ( $0.07 \text{ d}^{-1}$ ) obtingut correspon al primer mostreig que es va realitzar passats 7 dies de la posada en marxa del cultiu.

Les taxes de creixement dels períodes 7-14 i 14-21 dies, no presenten gaire diferència, però la del període 0-7 dies és aproximadament la meitat que la del cultiu en l'últim període (14-21 dies). Això pot haver estat degut al fet que durant aquests primers 7 dies, el pH del cultiu va ser molt bàsic, el qual va tenir un valor mitjà de  $9.16 \pm 0.3$ .

Les variacions de pH són degudes a l'activitat fotosintètica (alcalinització) i la respiració (acidificació) del medi per *U. ohnoi* durant els períodes de llum i de foscor, respectivament. Aquesta variació és deguda al fet que la fotosíntesi requereix carboni procedent, principalment, del bicarbonat del medi el que provoca una pèrdua de la capacitat amortidora del medi i un augment del pH. Durant els períodes de foscor, la respiració de la biomassa d'algues allibera  $\text{CO}_2$  al medi, el que implica la seva acidificació, per aquest motiu els pics de pH es presenten durant els períodes de llum, com podem observar als valors de les condicions de cultiu (Taula 1).

Com s'ha esmentat anteriorment el pH és un paràmetre important en el cultiu, ja que afecta l'equilibri químic de les espècies, especialment el de les espècies carbonatades. A valors de pH per sobre de 8 aproximadament, el carboni es troba en forma de carbonat, aquest fet provoca que les algues no puguin fixar el carboni, ja que no són capaces de fixar-lo en aquesta forma. Tenint en compte que els primers 7 dies, el cultiu va estar a pH molt bàsics, podem atribuir aquesta baixa taxa de creixement a aquest paràmetre, ja que les algues no eren capaces de fixar el carboni i com a conseqüent no augmentava la seva biomassa.

Per tal de controlar el pH en el cultiu, durant els 14 dies restants del cultiu, es va fer un control sobre el pH. Per tal de mantenir el pH a 8 aproximadament, es va anar afegint una dissolució d'àcid clorhídric al medi.

En estudis anteriors (Lodeiros, 2017), en els quals s'ha estudiat com afecten les variacions de pH en el creixement d'*Ulva ohnoi*, s'han obtingut resultats semblants. A pH controlats amb un valor mitjà de  $8.16 \pm 0.3$  van obtenir una taxa de creixement de  $0.09 \text{ d}^{-1}$  aproximadament, en canvi, a pH no controlats amb un valor mitjà de  $9.45 \pm 0.5$  van obtenir una taxa de creixement de  $0.06 \text{ d}^{-1}$  aproximadament.

## 4.2. Segon cultiu

Al segon cultiu es van fer tres mostrejos, dels quals es van obtenir 3 fotografies (Fig 22)

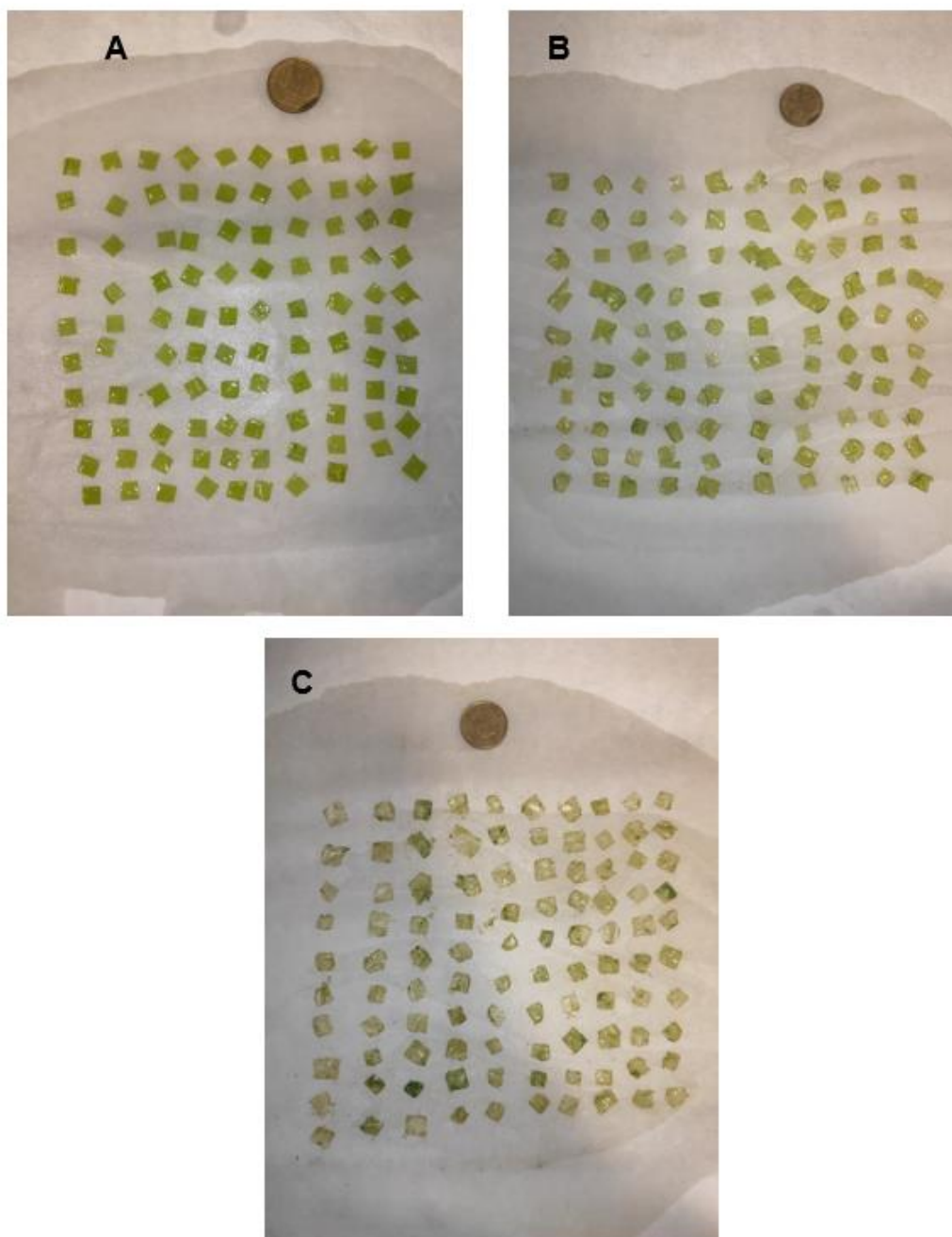


Fig 22 Fotografies corresponents als mostrejos realitzats durant el segon cultiu. Entre cada mostreig hi ha una diferència de 7 dies. A) Fotografia realitzada dia 0 B) Fotografia realitzada dia 7 C) Fotografia realitzada dia 14. (Fotografies realitzades per Nicole Lima Fermin, ESAB, UPC, 2020)

Com podem observar a la imatge anterior (Fig 22), la mostra inicial (A) presenta una forma quadrada uniforme, en canvi, la mostra (B) presenta fragments grans que fan la impressió que inicialment no es van tallar bé. Pel que fa a la mostra (C) podem observar un canvi de tonalitat i textura en les algues, no s'ha obtingut una quarta fotografia, com

en el primer cultiu, perquè es va produir una mort cel·lular, les algues van patir de forma considerable una pèrdua de clorofil·la que es podia apreciar simple vista.

Exactament com en el cultiu anterior es van tractar aquestes imatges amb el programari ImageJ, els resultats dels quals es trobem especificats a l'Annex D.

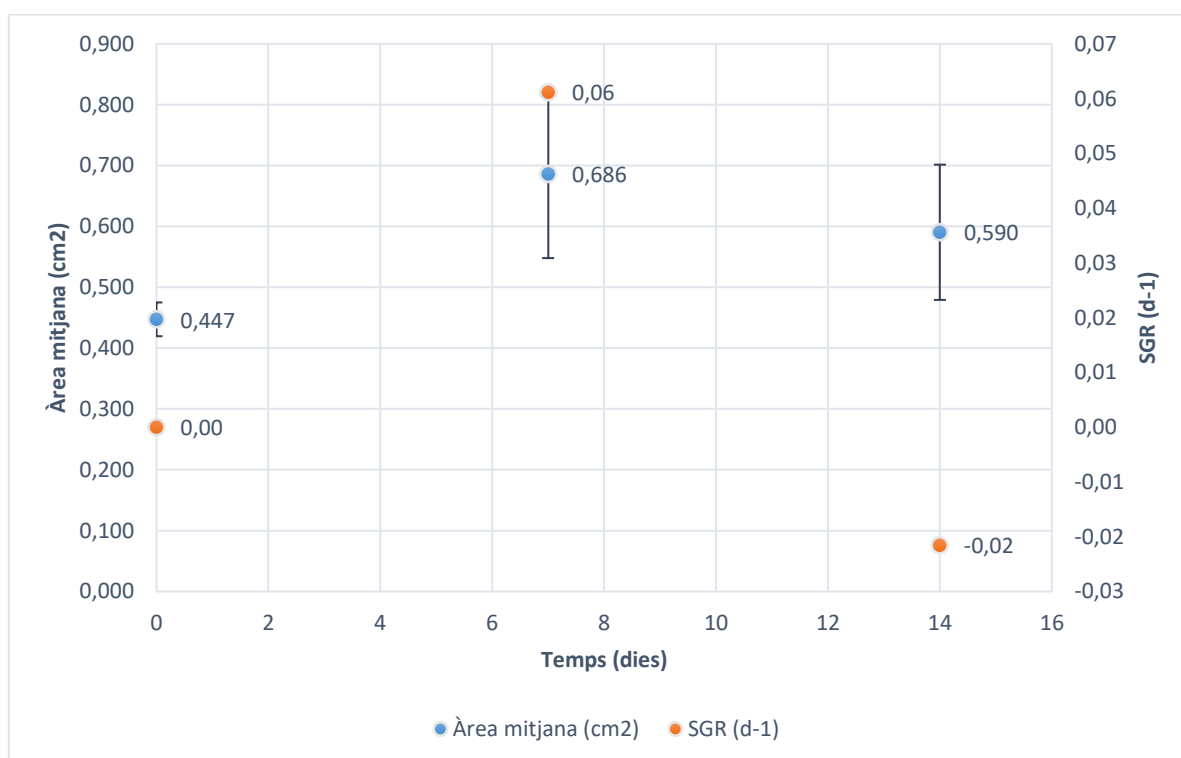
A la Taula 3 hi trobem una síntesi d'aquests resultats expressats com la mitjana, amb la respectiva desviació estàndard i variància.

*Taula 3 Resultats àrees mitjanes en funció del temps del segon cultiu, amb la respectiva desviació estàndard i variància, i el SGR (o taxa de creixement) obtinguts en cada mostreig.*

Temps (dies)	Àrea mitjana (cm <sup>2</sup> )	Desviació estàndard	Variància	SGR (d <sup>-1</sup> ) <sup>(*)</sup>
0	0.444	0.018	0.0003	
7	0.678	0.103	0.011	0.06
14	0.586	0.079	0.006	-0.02

<sup>(\*)</sup> Fa referència al període de 7 dies.

Els resultats especificats a la Taula 3 indiquen que l'àrea màxima assolida pel cultiu va ser durant el període de 0-7 dies, adquirint una àrea mitjana de  $0.678 \pm 0.103$  cm<sup>2</sup>. Tot i que el cultiu va tenir una durada de 14 dies, en el període de 7-14 dies es va obtenir una àrea mitjana de  $0.586 \pm 0.079$  cm<sup>2</sup>, sent aquest valor inferior al que s'havia assolit en el període anterior, i que també queda reflectit en el SGR que ha resultat en un valor negatiu.



*Fig 23 Evolució àrees mitjanes en funció del temps en el segon cultiu, les barres d'error representen la desviació estàndard.*

Com podem veure a la Fig 23, l'àrea mitjana en funció del temps és creixent en el primer període de 0-14 dies, ja que en el període de 7 a 14 dies pateix una davallada. Tenint



en compte aquests resultats, no tenim suficients evidències per poder entendre el comportament i l'evolució del creixement en aquest cultiu.

Els resultats obtinguts a partir del càlcul de la taxa de creixement específica, es troben especificats a la Taula 3 i representats a la Fig 23 en funció del temps.

En aquest cultiu, el SGR màxim assolit ha estat de  $0.06 \text{ d}^{-1}$  en el període de 0-7 dies. Aquest valor no difereix significativament del valor obtingut en aquest mateix període en el cultiu anterior, el qual va tenir un valor de  $0.07 \text{ d}^{-1}$ . Si comparem la magnitud d'aquests valors amb estudis previs (Bringué, 2019), en els quals s'han cultivat algues en fotobiorreactors, es van obtenir taxes de creixement d'aproximadament  $0.3 \text{ d}^{-1}$  que en comparació amb els valors obtinguts en aquest experiment són considerablement superiors.

Per altra banda, en el període de 7-14 dies, s'ha produït una davallada de l'àrea mitjana i com a conseqüent de la taxa de creixement del cultiu, la qual és un valor negatiu, d'exactament  $-0.02 \text{ d}^{-1}$ . El fet que la taxa de creixement sigui negativa, indica que el cultiu ha patit danys, en aquest cas i com s'ha esmentat anteriorment, en aquest període el cultiu va patir danys considerables que es podíem apreciar a simple vista, la seva textura es va tornar fràgil i la seva tonalitat es va tornar pàl·lida, pel que es va deduir que s'havia produït una mort cel·lular.

Aquest fet pot haver estat provocat per excés d'irradiància. En el cultiu anterior la linealitat de la taxa de creixement ja suggeria, que la llum no era un factor limitant, el que pot portar a fotosaturació o inclús fotoinhibició. La fotoinhibició, pot ser reversible, jugant un paper de protecció dels fotosistemes, però també reflecteix un dany que ja ha afectat a l'aparell fotosintètic, en el qual cas, és irreversible. A més d'una alta irradiància, aquest cultiu ha patit altes temperatures (temperatura mitja de  $26.9 \pm 4.2^{\circ}\text{C}$  amb els llums encesos i de  $24.9 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$  amb els llums apagats), a causa de l'energia calorífica transmesa pels llums LED i per la temperatura, que en aquesta època de l'any (Juny 2020) és més elevada que en el cultiu anterior (Febrer – Març 2020).

Aquesta alta irradiància constant, juntament amb una alta temperatura han portat al cultiu a una mort cel·lular.

Alguns autors (Rorrer and Cheney, 2004), especifiquen que en els cultius de macroalgues, el creixement es saturat per la llum a intensitats de llum relativament baixes. Mencionen que la fotoinhibició s'observa en moltes macroalgues però només a intensitats de llum superiors a  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Coutinho and Zingmark, 1987), en canvi les suspensions de macroalgues es cultiven en fotobiorreactors amb intensitats de llum incidents per sota dels  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , molt per sota del llindar de la fotoinhibició.

Si ho comparem amb altres estudis en els quals s'avalua el creixement d'*Ulva ohnoi* (Oca et al, 2018). En aquest estudi a diferència del present treball les algues es cultivaven en tancs amb parets opaques i llum només superficial, s'han obtingut resultats semblants als quals a irradiàncies elevades ( $886 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) i densitats de cultiu baixes ( $0.17 \text{ kg/m}^2$ ), les algues van patir danys, es va observar una reducció de l'àrea dels tal·lus juntament amb una pèrdua de clorofil·la.

### 4.3. Tercer cultiu

En aquest últim cultiu es van realitzar dos mostrejos, dels quals es van obtenir 2 fotografies (Fig 24)

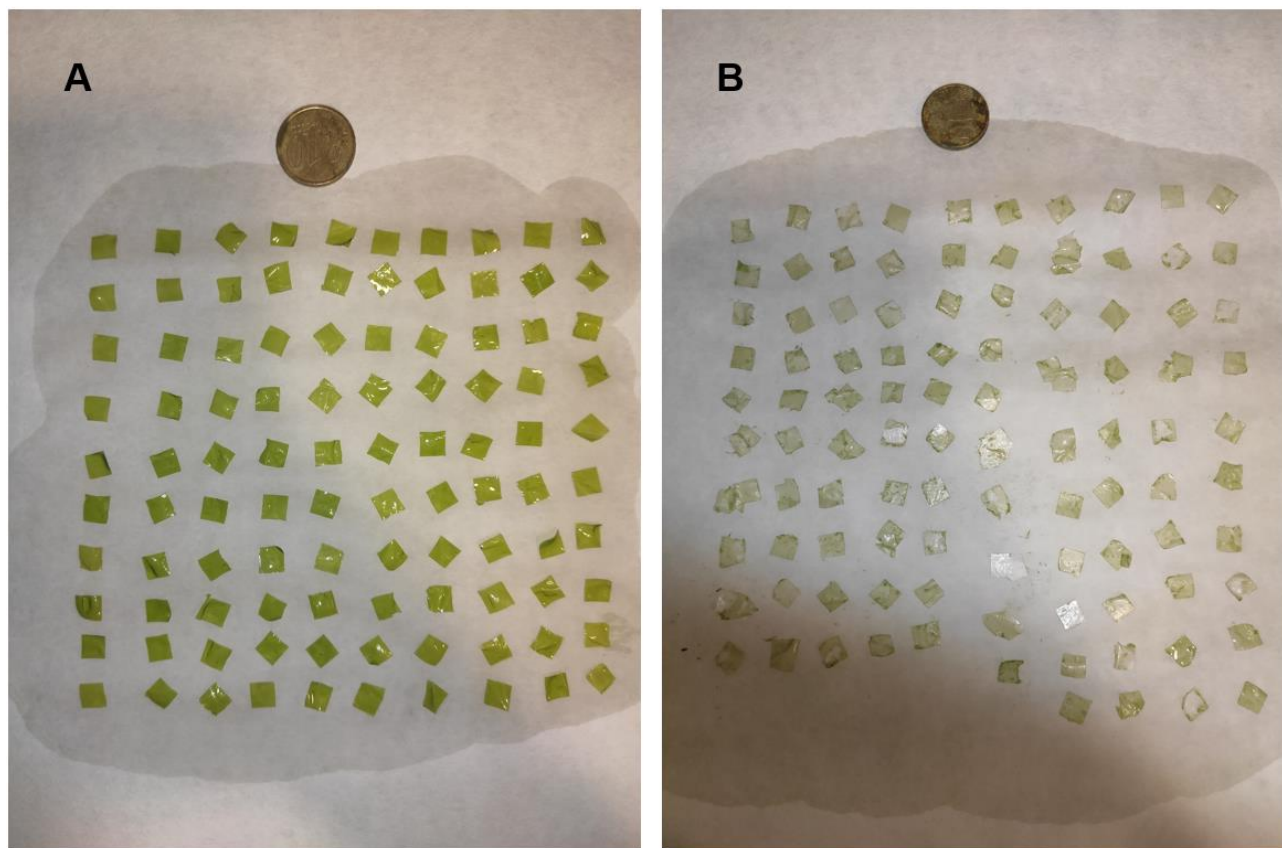


Fig 24 Fotografies corresponents als mostrejos realitzats durant el tercer cultiu. Entre cada mostreig hi ha una diferència de 7 dies. A) Fotografia realitzada dia 0 B) Fotografia realitzada dia 7 (Fotografies realitzades per Nicole Lima Fermin, ESAB, UPC, 2020)

Tenint en compte els resultats del segon cultiu, en aquest tercer cultiu es va optar per augmentar la densitat d'algues, amb l'objectiu de disminuir la quantitat d'irradiància rebuda per les algues, afavorint així a l'efecte *self-shading*.

En aquest cas, i a diferència dels cultius anteriors, només es van poder realitzar dos mostrejos, ja que com es pot observar a la imatge Fig 24 (B), igual que al segon cultiu es va produir una mort cel·lular. Com es pot veure, en aquest cas les algues també van perdre la seva tonalitat i van adquirir una textura fina, per el qual es podíem trencar amb facilitat, fet que dificultava la seva manipulació per realitzar la fotografia. Com a conseqüència alguns fragments, es van trencar en realitzar el mostreig.

A diferència del segon cultiu, en aquest cas la mort cel·lular es va produir passats només 7 dies de la posada en marxa del cultiu, que en el segon cultiu es va produir al cap de 14 dies.

Els resultats obtinguts del tractament d'aquestes dues imatges es troben especificats a l'Annex D.

La Taula 4 mostra una síntesi d'aquests resultats expressats com la mitjana, amb la respectiva desviació estàndard i variància.

*Taula 4 Resultats àrees mitjanes en funció del temps del tercer cultiu, amb la respectiva desviació estàndard i variància, i el SGR (o taxa de creixement) obtinguts en cada mostreig.*

Temps (dies)	Àrea mitjana (cm <sup>2</sup> )	Desviació estàndard	Variància	SGR (d <sup>-1</sup> ) <sup>(*)</sup>
0	0.381	0.031	0.001	
7	0.535	0.156	0.024	0.05

(\*) Fa referència al període de 7 dies.

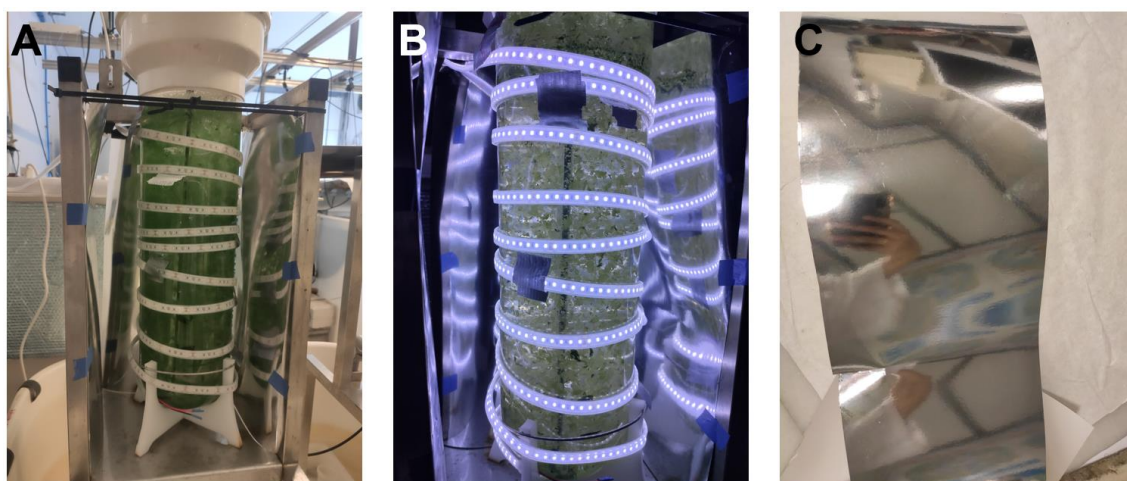
Com podem observar, en un període de 7 dies hi ha hagut un increment de l'àrea mitjana ( $0.535 \pm 0.156$  cm<sup>2</sup>). Aquest resultat és semblant als obtinguts en els cultius previs, especialment amb el primer cultiu amb el qual es va assolir una àrea mitjana de  $0.577 \pm 0.121$  cm<sup>2</sup>, en aquest mateix període.

Pel que fa a la taxa de creixement, el resultat en el període de 7 dies ha estat de 0.05 d<sup>-1</sup>, el qual, com amb el cas de l'àrea mitjana, és semblant als resultats obtinguts en els cultius anteriors.

En aquest cas, al només tenir dues dades de creixement, no tenim suficients evidències per poder entendre el comportament i l'evolució del creixement en aquest cultiu.

En aquest cas, igual que el segon cultiu, s'ha produït una mort cel·lular que pot ser atribuïda a una irradiància excessiva de manera continuada en el cultiu, a més de patir altes temperatures provocades per la combinació de l'energia calorífica que desprenen els llums LED i per l'alta temperatura ambient en aquesta època de l'any (Juny 2020), ha portat al cultiu a un estat de fotoinhibició.

Tenint en compte els efectes que va provocar la llum en tots dos casos (segon i tercer cultiu), es va optar per posar les llums LED dirigides cap enfora del cultiu, amb una cartolina reflectant al voltant com s'il·lustra a la Fig 25. Aquest canvi permet fer arribar al cultiu llum difusa en comptes de llum directa, que com s'ha vist en aquests resultats pot provocar grans danys en el cultiu, i a més podem disminuir l'energia calorífica transmesa al cultiu, la qual cosa permetrà disminuir la seva temperatura.



*Fig 25 Fotobiorreactor amb les llums dirigides cap enfora del cultiu i amb cartolina reflectant al voltant. A) Fotobiorreactor llums apagades B) Fotobiorreactor llums enceses i C) Cartolina reflectant utilitzada. (Fotografies realitzades per Nicole Lima Fermin, ESAB, UPC, 2020)*

Per tal de determinar que aquest canvi és efectiu, es va mesurar la irradiància al fotobiorreactor amb les llums dirigides cap enfora del cultiu, seguint el mateix mètode descrit a l'apartat de material i mètodes.

Els valors obtinguts d'aquestes mesures es troben especificats a la Taula 5, com la irradiància mitjana amb la seva respectiva desviació estàndard i variància.

Taula 5 Valors irradiància ( $\mu\text{mols}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) al cultiu en funció de la direcció de les llums LED.

		Irradiància mitjana ( $\mu\text{mols}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )	Desviació estàndard	Variància
<b>IRRADIÀNCIA DIRECTA</b>	Irradiància mitjana al cultiu	345	91	8275
	Punt entremig del LED	187	130	16957
	Punts sobre el LED	1052	144	20745
<b>IRRADIÀNCIA DIFUSA</b>	Irradiància mitjana al cultiu	99	39	1549
	Punt entremig del LED	113	36	1268
	Punts darrere el LED	119	35	1214

En la taula anterior es pot observar que existeix una diferència significativa en la irradiància que rep el cultiu, en funció de si es tracta d'una irradiància directa o indirecte al cultiu.

Podem veure que la irradiància mitjana que rep el cultiu és molt inferior quan aquesta es rep de manera indirecta ( $99 \pm 39 \mu\text{mols}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) que quan es rep de manera directa ( $345 \pm 91 \mu\text{mols}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), a més a més, podem dir que la irradiància té una distribució més uniforme dins del fotobiorreactor quan la irradiància es rep de manera indirecta. Si ens fixem en els punts situats entremig de la tira de LED i sobre la tira de LED quan la llum és indirecte, podem veure que no existeix una gran diferència, en canvi, quan la llum és directa trobem punts del fotobiorreactor que arriben als  $1052 \pm 144 \mu\text{mols}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , aquesta alta irradiància pot resultar abrasiva per les algues, que com s'ha vist en els resultats anteriors pot arribar a provocar un estat de fotoinhibició en el cultiu, provocant danys irreversibles en l'aparell fotosintetitzador de les algues.

#### 4.4. Determinació clorofil·les

Tenint en compte els resultats anteriors, es va decidir fer una mesura de la concentració de clorofil·les a les algues, al final del cultiu tant del segon com del tercer cultiu. El procediment realitzat per fer aquestes mesures es troba descrit a l'apartat de material i



mètodes. Els resultats d'aquestes mesures es troben detallats a l'Annex G, a la Taula 6 es fa una síntesi d'aquests resultats.

*Taula 6 Resultats determinació concentració de clorofil·les ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ), corresponents al segon i tercer cultiu, i a les algues del tanc N2. Els resultats es troben expressats com la mitjana d'aquestes mesures, amb la respectiva desviació estàndard i variància.*

	Mitjana ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ )	Desviació estàndard	Variància
<b>Concentració de clorofil·la final segon cultiu</b>	27.4	8.4	70.1
<b>Concentració de clorofil·la final tercer cultiu</b>	18.1	3.8	14.2
<b>Concentració de clorofil·la tanc N2</b>	89.2	21.6	465.8

Com podem contemplar a la taula anterior, la concentració de clorofil·les al final de cada cultiu és considerablement inferior a la concentració inicial, que correspon a la concentració de clorofil·les del tanc N2. al llarg del cultiu s'ha produït una reducció de la concentració de clorofil·les del 20% i del 30% en el segon i tercer cultiu respectivament. Aquests resultats van amb concordança amb els resultats discutits anteriorment, en els quals en primer lloc s'ha pogut observar en les fotografies Fig 22 (C) i Fig 24 (B) que les algues van perdre la seva tonalitat i textura inicial. A més, en el cas dels resultats de creixement pel segon cultiu s'han obtingut taxes de creixement negatives, els quals poden ser atribuïts a aquesta pèrdua de clorofil·la en les algues, que com a conseqüència han provocat una disminució en l'activitat fotosintètica de la biomassa.

Altrament, si tenim en compte les condicions de cultiu (Taula 1), podem observar com el cas del primer cultiu, en el qual s'han obtingut taxes de creixement superiors, les concentracions d' $\text{O}_2$  són superiors amb els llums encesos en relació amb les concentracions d' $\text{O}_2$  en el segon i tercer cultiu.

A més a més, com s'ha discutit anteriorment, en el primer cultiu es van donar alts valors de pH. Tenint en compte aquest fet podem deduir que la biomassa ha estat fotosintèticament activa, ja que al realitzar la fotosíntesi s'ha produït  $\text{O}_2$ , fet que ha esdevingut en una alta concentració d'oxigen i baixa alcalinitat, ja que les algues en fixar el carboni present al medi fan disminuir com a conseqüència l'alcalinitat, la concentració d' $\text{O}_2$  juntament amb la baixa alcalinitat han provocat els alts valors de pH.

En el cas del segon i tercer cultiu, podem observar que la concentració d' $\text{O}_2$  tant amb els llums encesos com amb els llums apagats és similar, el que indicaria que el cultiu d'algues no és fotosintèticament actiu. Fet que ha estat degut a la pèrdua de clorofil·la en el cultiu, a causa de l'alta irradiància que ha rebut el cultiu i l'alta temperatura que ha patit de manera continuada, que han portat al cultiu a un estat de fotoinhibició.

#### 4.5. Avaluació aleatorietat dels mostrejos

Els resultats obtinguts es troben representats a les Fig 26 i Fig 27 pel primer cultiu, les Fig 29 i Fig 28 pel segon cultiu i la Fig 30 pel tercer cultiu.

Taula 7 Valors  $p$ , test de normalitat ( $\alpha=0.05$ ) en cada cultiu i mostreig.

Cultiu	Mostrejos	Valor $p$
Primer cultiu	0	0.009
	7	0.011
	14	0.006
	21	0.051
Segon cultiu	0	0.094
	7	<0.005
	14	0.050
Tercer cultiu	0	0.216
	7	<0.005

En el primer cultiu, com poden observar a les Fig 26 i Fig 27, en els tres primers mostrejos els punts traçats no formen una línia recta, el que indica que no segueixen una distribució normal, al contrari que en el cas de l'últim mostreig. A més a més, el valor  $p$  (Taula 7) de la prova és inferior a  $\alpha$  (0.05), el que indica que el test és significatiu en els casos dels tres primers mostrejos, en canvi, en l'últim mostreig aquest valor és superior. Per tant rebutgem la hipòtesi nul·la i acceptem la hipòtesi alternativa, la qual afirma que les dades no segueixen una distribució normal en el cas dels tres primers mostrejos i en el cas de l'últim mostreig concloem que segueix una distribució normal.

En el segon cultiu, com podem observar a les Fig 28 i Fig 29, en el cas del segon mostreig, els punts traçats no formen una línia recta, el que indica la mostra no segueix una distribució normal, el que també es veu plasmat a l'histograma i queda confirmat amb el test de normalitat, el valor  $p$  (Taula 7) del qual, en aquest cas, és inferior al valor de significació ( $\alpha=0.05$ ), pel qual podem afirmar que les dades no segueixen una distribució normal. En canvi, en el cas del primer i tercer mostreig (Fig 28) podem veure que els punts s'ajusten a una línia i el valor  $p$  és superior a  $\alpha$ , per tant podem dir que aquestes mostres han estat seleccionades a l'atzar.

Pel que fa al tercer cultiu, podem veure a la Fig 30, que en el cas del primer mostreig els punts traçats formen una línia recta, el que indica que la mostra segueix una distribució normal, aquest fet queda corroborat a partir del valor  $p$  (0.216), el qual té un valor superior al valor de significació ( $\alpha=0.05$ ). El contrari passa amb la mostra del segon mostreig, en la qual els punts traçats no segueixen una línia recta i el valor  $p$  (<0.005) és inferior al nivell de significació. Per tant podem concloure que en aquest cas la primera mostra ha estat seleccionada a l'atzar pel contrari la segona mostra no, ja que, segons els resultats no segueix una distribució normal.

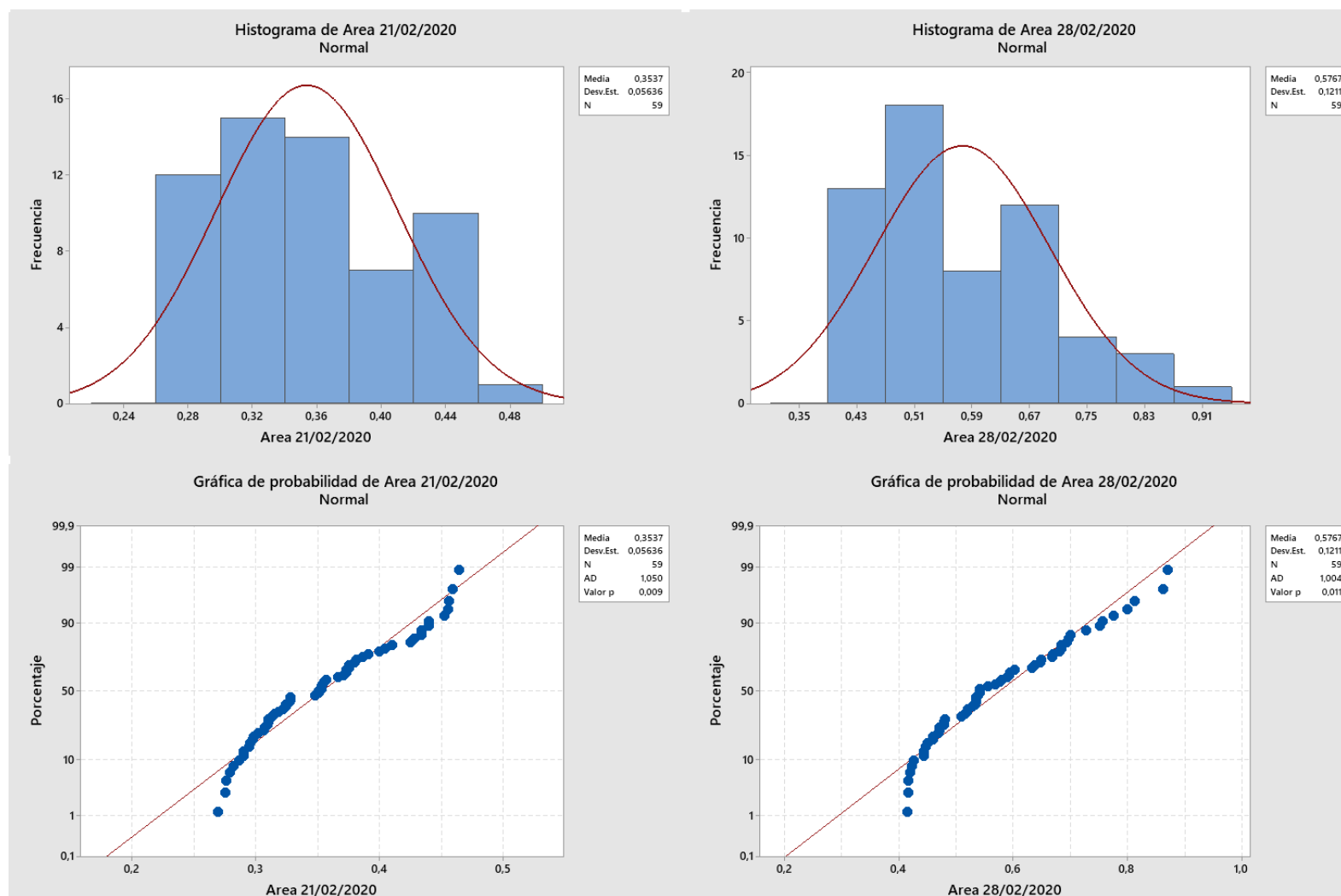


Fig 26 Gràfica de probabilitat i histograma corresponents als valors de les àrees obtingudes al primer cultiu, al primer mostreig 21/02/2020 (0 dies) i segon mostreig 28/02/2020 (7 dies)

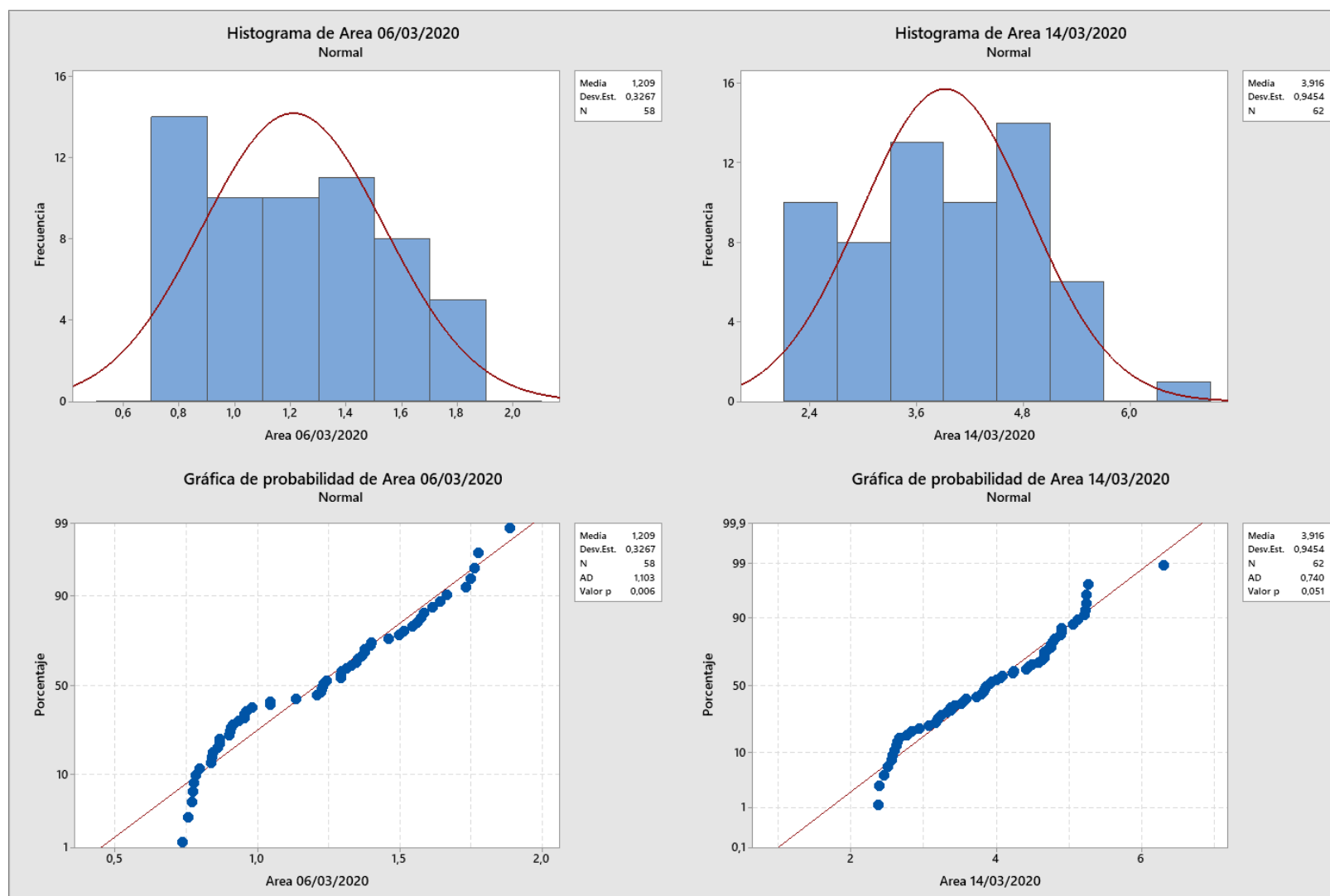


Fig 27 Gràfica de probabilitat i histograma corresponents als valors de les àrees obtingudes al primer cultiu, al tercer mostreig 06/03/2020 (14 dies) i quart mostreig 14/03/2020 (21 dies)



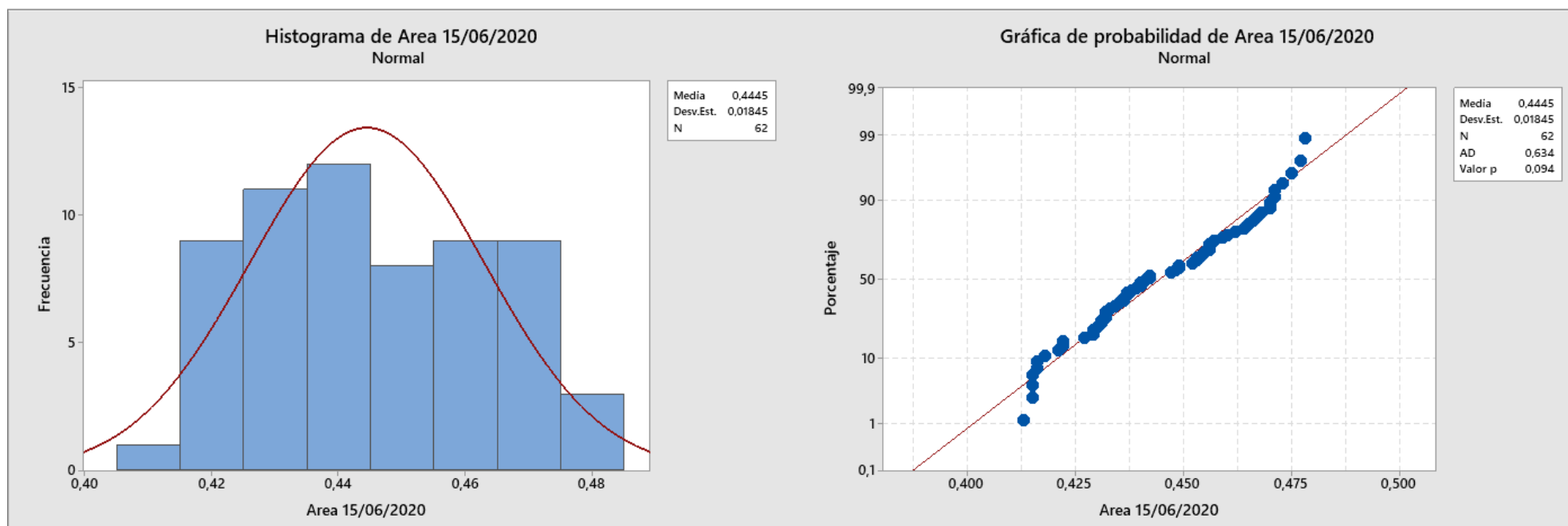


Fig 28 Gràfica de probabilitat i histograma corresponents als valors de les àrees obtingudes al segon cultiu, al primer mostreig 15/06/2020 (0 dies

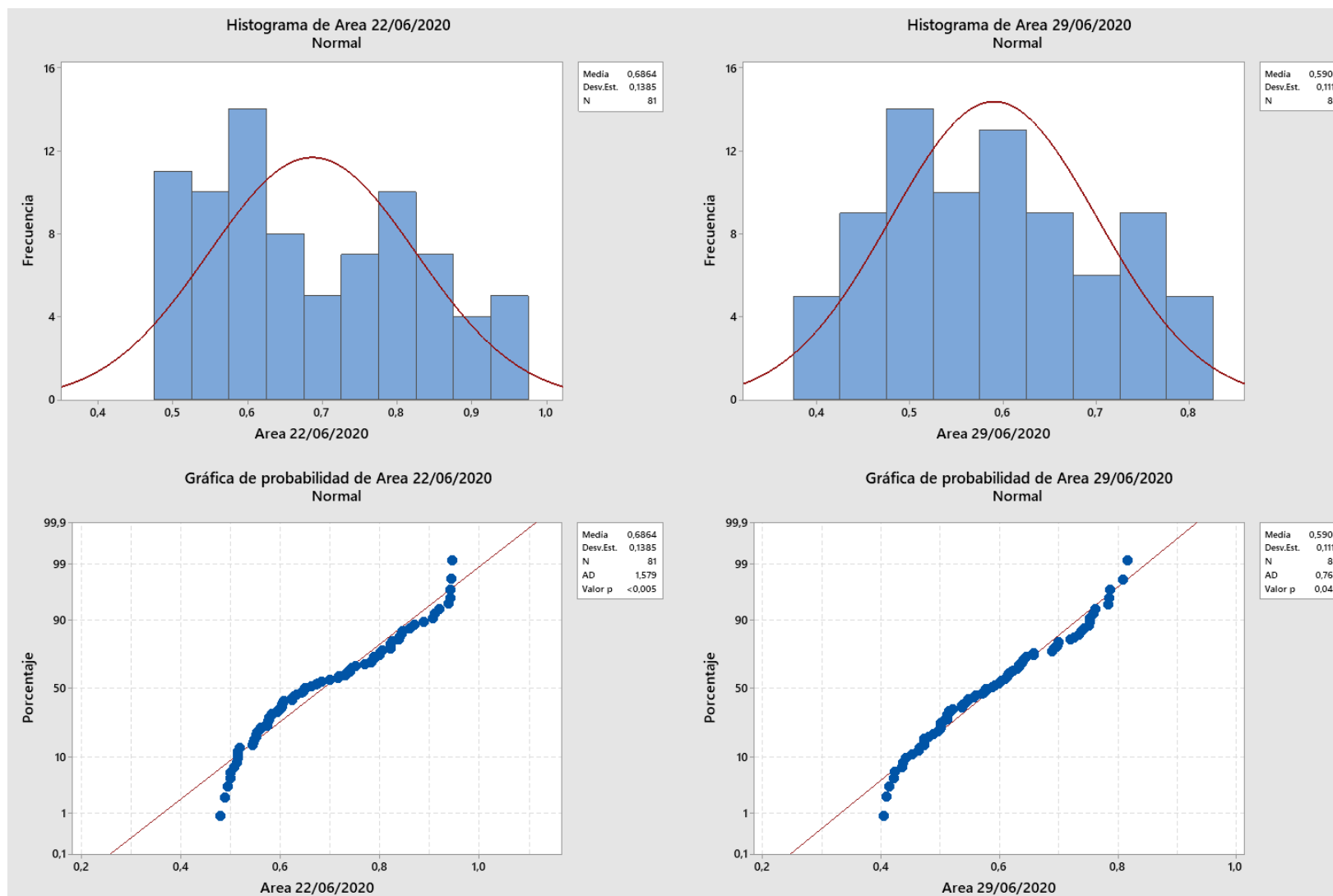


Fig 29 Gràfica de probabilitat i histograma corresponents als valors de les àrees obtingudes en el segon cultiu, al segon mostreig 22/06/2020 (7 dies) i tercer mostreig 29/06/2020 (14 dies)

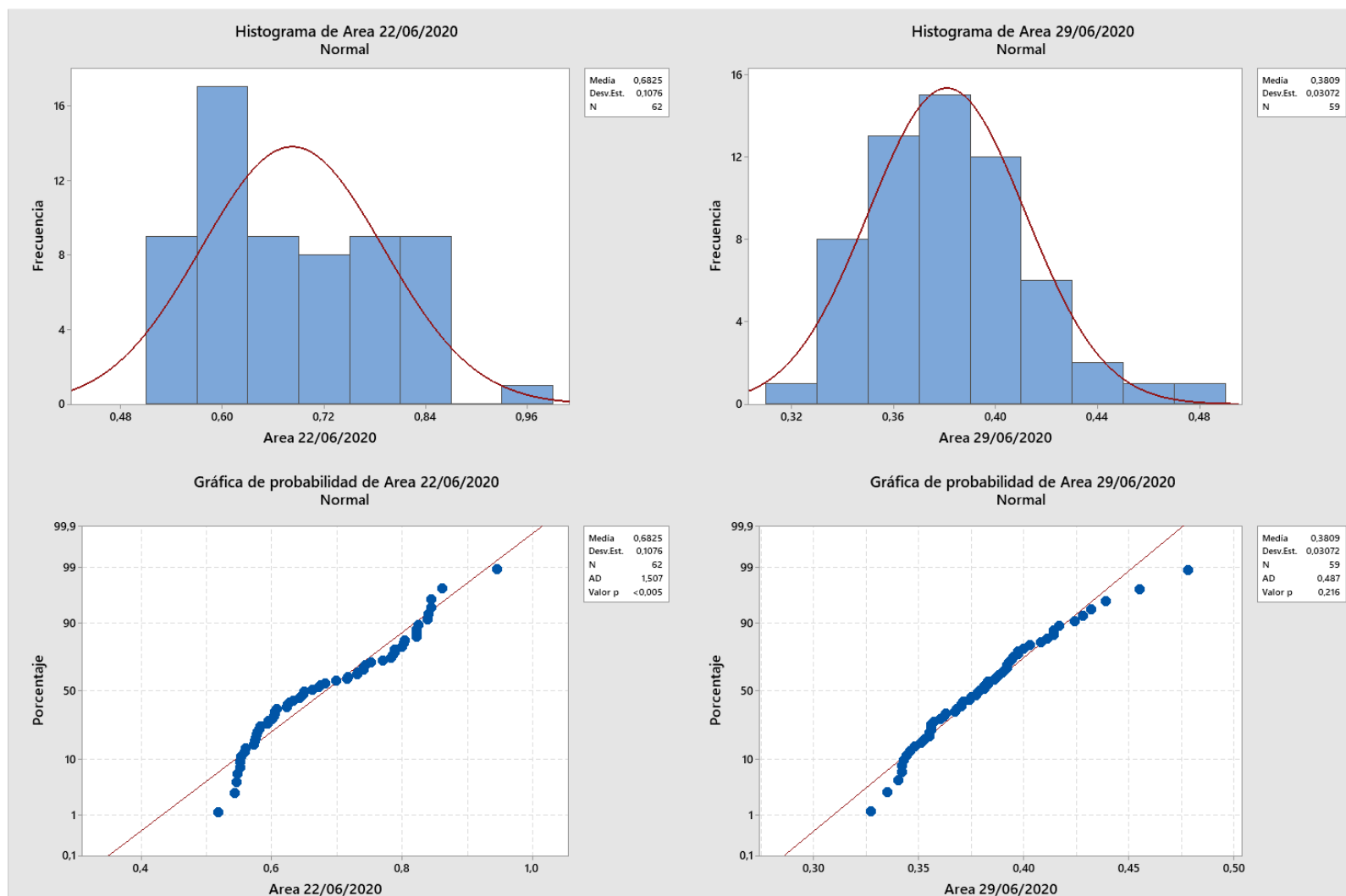


Fig 30 Gràfica de probabilitat i histograma corresponents als valors de les àrees obtingudes en el tercer cultiu, al primer mostreig 29/06/2020 (0 dies) i segon mostreig 06/07/2020 (7 dies)

## 5. CONCLUSIONS

Tenint en compte els resultats obtinguts a partir de la recerca bibliogràfica, així com del treball experimental realitzat durant aquest treball, s'extreuen les següents conclusions.

La taxa de creixement màxima obtinguda durant aquest experiment, ha estat en l'últim període (14-21 dies) del primer cultiu, la qual té un valor de  $0.14 \text{ d}^{-1}$ . A més a més, en el cas d'aquest primer cultiu, s'ha vist com la taxa de creixement segueix un creixement lineal, fet que suggereix que la irradiància en el cultiu no ha estat un factor limitant.

En el segon i tercer cultiu, com que no s'han aconseguit dades suficients, no s'han obtingut prou evidències per poder entendre el comportament i l'evolució del creixement en aquests cultius.

Les taxes de creixement obtingudes en aquest estudi, comparades amb estudis previs, són considerablement inferiors. Aquests resultats, podem concloure que han estat deguts al fet que no s'han aconseguit les condicions ambientals idònies dins del fotobiorreactor, principalment pel que fa al pH en el cas del primer cultiu, i la irradiància i la temperatura en el segon i tercer cultiu, en els quals s'ha produït un estat de fotoinhibició que ha provocat una pèrdua de la concentració de clorofil·les en les algues del 20% i 30% respectivament.

Tenint en compte aquests resultats s'ha de destacar la importància de mantenir les condicions idònies en el fotobiorreactor per tal de maximitzar les taxes de creixement i assegurar la viabilitat del cultiu al llarg del temps.

Un altre punt a tenir en compte, és l'aleatorietat amb la qual s'han fet els mostrejos, com s'ha vist en els resultats anteriors, només 4 dels 9 mostrejos, que s'han realitzat durant els tres cultius, es poden considerar que han estat seleccionats a l'atzar, els mostrejos restants no segueixen una distribució normal i per tant no podem considerar que han estat seleccionats a l'atzar. El fet que les mostres segueixin una distribució normal, és important per tal d'obtenir una mostra representativa de la població, en aquest cas el cultiu d'algues.

Per concloure aquest treball, s'ha de mencionar que per haver obtingut resultats significatius, s'haurien d'haver realitzat més cultius. A causa de la pandèmia provocada pel virus Covid-19, no s'ha pogut dur a terme el treball experimental tal com es tenia previst.

## 6. PERSPECTIVA PER FUTURS ESTUDIS

Tenint en compte els resultats obtinguts en aquest treball i una vegada finalitzat aquest estudi. Per futurs estudis relacionats amb el creixement de la *Ulva* en fotobiorreactors, tindria en compte els punts que es detallen a continuació.

En primer lloc s'ha de destacar la importància de mantenir les condicions idònies en el cultiu, al tractar-se d'un cultiu viu en el qual les condicions ambientals varien al llarg del dia en funció de l'activitat fotosintètica de la biomassa, des d'un punt de vista tècnic seria interessant poder monitorar el cultiu, de manera que en funció dels paràmetres presents en el cultiu el propi fotobiorreactor sigui capaç de mantenir les condicions òptimes pel cultiu.

Aquest disseny permetria estudiar més exhaustivament el comportament del cultiu en funció dels paràmetres ambientals i avaluar com afecten aquests paràmetres en el creixement de la *Ulva*, a més que permetria assegurar la viabilitat del cultiu al llarg del temps.

Respecte a la disposició dels llums en el fotobiorreactor, seria interessant estudiar quina disposició és la més idònia pel creixement de la *Ulva*, per tal d'evitar estats de fotoinhibició o altes temperatures al cultiu.

Tal com s'ha mencionat anteriorment, seria convenient realitzar més cultius per tal d'obtenir resultats significatius i concloents. Per tal de millorar aquest fet, es podrien realitzar diferents cultius simultanis en diferents fotobiorreactors, a més a més, es podrien realitzar mostrejos en intervals de temps més reduïts, en aquest treball s'han realitzat cada 7 dies, aquests mètodes permetrien obtenir més dades amb les quals es podrien fer estudis estadístics més exhaustius.

Tenint en compte els resultats obtinguts en aquest estudi, s'ha determinat que s'ha produït una disminució en la concentració de clorofil·la en els fragments d'alga, en futurs estudis convindria fer una quantificació de clorofil·la en cada mostreig, amb l'objectiu d'avaluar com evoluciona la concentració de clorofil·la en els fragments al llarg del temps.

Un altre punt a tenir en compte per futurs estudis és millorar l'aleatorietat amb la qual es realitzen els mostrejos per tal de tenir una mostra representativa de la població. Per tal de millorar la tècnica de mostreig per futurs estudis, recomanaria que s'escollís una mostra de la població de 200 fragments aproximadament, aquests 200 fragments els identifiquem i els hi assignem un valor de 0 o 1 de manera aleatòria amb l'ajuda de la funció aleatòria que proporciona el programari Excel, una vegada assignats els valors eliminem les dades que tenen el valor de 0 i ens quedem amb les dades a les quals els correspon el valor 1, d'aquesta manera els valors finals hauran estat escollits a l'atzar, d'aquesta manera es podria reduir la intencionalitat de la persona que realitza el mostreig.

## 7. BIBLIOGRAFIA

### Referències bibliogràfiques

- Almazan, J. L. (2008)** 'Algae - Biodiesel de Algas', ETSI:Universidad Politécnica de Madrid, (July), pp. 1–8. Available at: <http://www.algae.com.br/>.
- APROMAR (2014)** Tomo 1: Estudio General: Una aproximación al sector de las macroalgas. Evaluación del estado de explotación y propuestas de gestión sostenible y cultivo de macroalgas en Andalucía, Asturias y Galicia (pp 1-92). Available at: <http://www.apromar.es/content/proyecto-sobre-la-gestión-sostenible-y-cultivo-de-macroalgas> (Accessed: 30 June 2020).
- Bosca, C., Dauta, A. and Marvalín, O. (1991)** 'Intensive outdoor algal cultures: How mixing enhances the photosynthetic production rate', *Bioresource Technology*, 38(2–3), pp. 185–188. doi: 10.1016/0960-8524(91)90152-A.
- Bringué, J. (2019)** 'Importància de la mida i tipus de fragment en la taxa de creixement d' *Ulva ohnoi* i estudi de la reactivació post període de manteniment en refrigerador. Treball Final de Grau Universitat Politècnica de Catalunya 2019.'
- Casais E. (2016)** 'Desarrollo de cultivos de *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) como biofiltro en sistemas de acuicultura multitrofica integrada (AMTI)', *Algas, Boletín Informativo de la Sociedad Española de Ficología*, 52, pp. 36–39.
- Chopin, T. et al. (2001)** 'Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: a key toward sustainability', *Journal of Phycology*, 37(6), pp. 975–986. doi: 10.1046/j.1529-8817.2001.01137.x.
- Coutinho, R. and Zingmark, R. (1987)** 'Diurnal photosynthetic responses to light by macroalgae', *Journal of Phycology*. John Wiley & Sons, Ltd, 23(s2), pp. 336–343. doi: 10.1111/j.1529-8817.1987.tb04142.x.
- Curra Feijoó, N. (2017)** '*Ulva ohnoi* (Ulvales, Chlorophyta) comobiofiltro en sistemas AMTI-RAS: Influencia en su desarrollo de las concentraciones de nitrógeno y fósforo del medio de cultivo'.
- Escribano, A. (2019)** 'Morfología y productividad de *Ulva ohnoi*: Fotobiorreactores, cultivo de fragmentos de talo en tanques y cuerdas. Trabajo final de Grado Universidad Politécnica de Catalunya (UPC), Enero 2019.'
- FAO (2004)** 'El estado mundial de la acuicultura'.
- Ghaderiardakani, F., Coates, J. C. and Wichard, T. (2017)** 'Bacteria-induced morphogenesis of *Ulva intestinalis* and *Ulva mutabilis* (Chlorophyta): a contribution to the lottery theory', *FEMS microbiology ecology*, 93(8), pp. 1–12. doi: 10.1093/femsec/fix094.
- González Céspedes, A. M. (2016)** 'Cultivos De Microalgas a Gran Escala: Sistemas De Producción 1. Introducción', *ADNAgro*, p. 14.
- Hiraoka, M. et al. (2004)** 'A new green-tide-forming alga, *Ulva ohnoi* Hiraoka et Shimada sp. nov. (Ulvales, Ulvophyceae) from Japan', *Phycological Research*, 52(1), pp. 17–29. doi: 10.1111/j.1440-1835.2004.tb00311.x.



- Huang, Q. et al. (2017)** 'Design of Photobioreactors for Mass Cultivation of Photosynthetic Organisms', Engineering. Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company, 3(3), pp. 318–329. doi: 10.1016/J.ENG.2017.03.020.
- De la Cruz, À. (2018)** 'Balanç d' oxigen i diòxid de carboni en instal·lacions d' aqüicultura multitròfica ( IMTA ) de peixos i algues. Treball Final de Grau Universitat Politècnica de Catalunya 2018.'
- Lodeiros Chacón, C. (2017)** 'Ulva ohnoi (Ulvales, Chlorophyta) as a biofilter in IMTARAS systems: Influence in its development of pH and alkaline reserve of the culture medium'.
- Muñoz, J. L. and Cárdenas, S. (2011)** 'Acuicultura Integrada y Ecológica', Jornada de Acuicultura Sostenible y Ecológica, (February 2011), pp. 1–48.
- Nunes, N. et al. (2017)** 'Biochemical composition, nutritional value, and antioxidant properties of seven seaweed species from the Madeira Archipelago', Journal of Applied Phycology. Journal of Applied Phycology, 29(5), pp. 2427–2437. doi: 10.1007/s10811-017-1074-x.
- Quitral R., V. (2012)** 'Nutritional and health properties of seaweeds and its potential as a functional ingredient', 53(1), pp. 35–43. doi: 10.4067/s0717-92272015000100005.
- Romero-Morales, M. A., Ortiz-Villota, M. T. and Meza-Rodríguez, L. D. (2018)** 'La biorremediación con microalgas (Spirulina máxima, Spirulina platensis y Chlorella vulgaris) como alternativa para tratar la eutrofización de la laguna de Ubaque, Colombia', Revista De Investigación, Desarrollo E Innovación, 9(1), pp. 163–176. doi: 10.19053/20278306.v9.n1.2018.8153.
- Rorrer, G. L. and Cheney, D. P. (2004)** 'Bioprocess engineering of cell and tissue cultures for marine seaweeds', in Aquacultural Engineering. Elsevier, pp. 11–41. doi: 10.1016/j.aquaeng.2004.03.007.
- Suh, I. S. and Lee, C. G. (2003)** 'Photobioreactor engineering: Design and performance', Biotechnology and Bioprocess Engineering, 8(6), pp. 313–321. doi: 10.1007/BF02949274.
- Traugott, H. et al. (2020)** 'Aeration and nitrogen modulated growth rate and chemical composition of green macroalgae *Ulva* sp. cultured in a photobioreactor', Algal Research, 47(March 2019). doi: 10.1016/j.algal.2020.101808.
- Wichard, T. (2015)** 'Exploring bacteria-induced growth and morphogenesis in the green macroalga order Ulvales (Chlorophyta)', Frontiers in Plant Science, 6(MAR), pp. 1–19. doi: 10.3389/fpls.2015.00086.

### Pàgines web consultades

- *Full-spectrum Quantum Sensors and Meters | Apogee Instruments* (no date). Available at: <https://www.apogeeinstruments.com/full-spectrum-quantum-sensor/> (Accessed: 30 June 2020)
- *Full-spectrum Quantum Sensors and Meters | Apogee Instruments* (no date). Available at: <https://www.apogeeinstruments.com/full-spectrum-quantum-sensor/> (Accessed: 30 June 2020).

- *Handy pH* - OxyGuard International A/S (no date). Available at: <https://www.oxyguard.dk/products/hand-held-instruments/handy-ph-2/> (Accessed: 30 June 2020).
- ONU (2015) 'Ods,Hambre Cero'. Available at: [www.zerohungerchallenge.org](http://www.zerohungerchallenge.org)

## ANNEXOS

Annex A. ImageJ

Annex B. Anàlisi alcalinitat

Annex C. Anàlisi de nitrats

Annex D. Resultats àrees fragments

Annex E. Diagrama experimental

Annex F. Dades experimentals dels paràmetres ambientals del fotobiorreactor

Annex G. Dades experimentals determinació clorofil·les

# ANNEX A

---

## ImageJ

## Annex A. ImageJ

ImageJ és un programa de processament d'imatges digitals de domini públic desenvolupat per l'institut nacional de salut (NIH). Aquest programa permet mostrar, editar, analitzar, processar, guardar i imprimir imatges. A més a més, amb aquest programa es poden mesurar, distàncies i angles, crear histogrames de densitat i gràfics de línia de perfil, és compatible amb funcions estàndard de processament d'imatges com funcions lògiques i aritmètiques entre imatges, manipulació del contrast, nitidesa, detecció de vores...

L'ús d'aquest programa ha estat indispensable per la realització d'aquest treball. Aquest programa ha permès analitzar les imatges obtingudes al llarg dels experiments, permetent d'aquesta manera mesurar les àrees dels fragments d'algues

A continuació es descriurà el protocol seguit per fer aquestes mesures d'àrees.

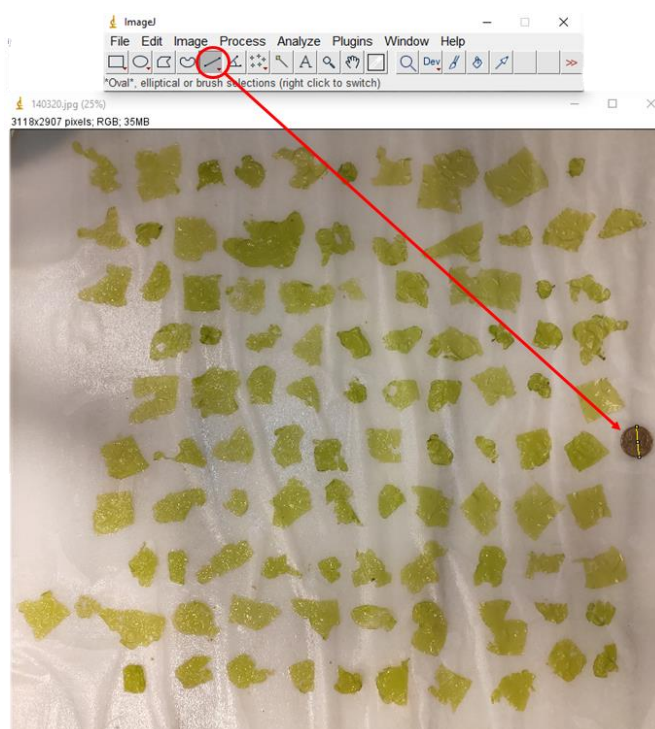
En primer lloc s'ha de procedir a la instal·lació del programa, al següent enllaç, <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>, es pot descarregar. Una vegada descarregat el fitxer, pel sistema operatiu corresponent, s'ha de procedir a la seva instal·lació. Es tracta d'una instal·lació simple, ja que només cal descomprimir la carpeta descarregada i crear un accés directe a l'escriptori.

Una vegada inicialitzat el programa es procedeix a obrir la imatge a analitzar:

1. File > Open > Seleccionem imatge a analitzar > Open

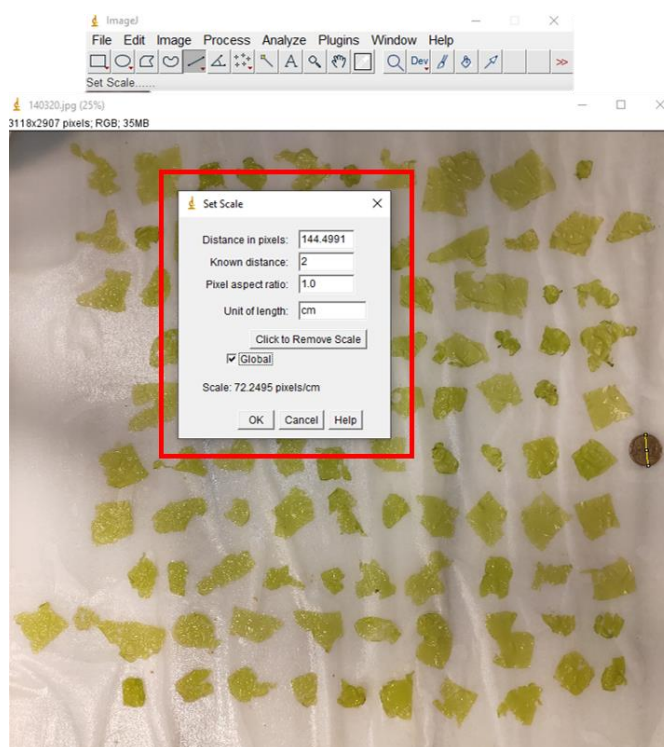
Seguidament s'ha de calibrar la imatge. La calibració de la imatge es basa a traduir els píxels que componen la imatge a distàncies, respecte d'algun punt a la imatge. Per això s'ha d'incloure a la imatge un objecte de dimensions conegudes, en aquest cas s'ha utilitzat una moneda.

2. \*Straight\* > Seleccionem la distància.



Una vegada seleccionada la nostra distància de calibratge, s'ha d'introduir al programa la mida real d'aquesta distància.

3. Analyze > Set Scale > Distance in pixels (Aquest valor correspon a la distància en pixels de la distància de referència) > Know distance ( aquest valor correspon a la mesura real de la distància de referència, en aquest camp hem d'introduir el valor del diàmetre de la moneda) > Unit of length (unitats de la distància coneguda, en aquest cas cm) > Ok



Una vegada la imatge està calibrada a la distància coneguda amb les seves respectives unitats. Prosseguim amb la mesura de les àrees.

4. Seleccionem la superfície de la imatge que volem seleccionar, en aquest cas, els fragments d'alga.

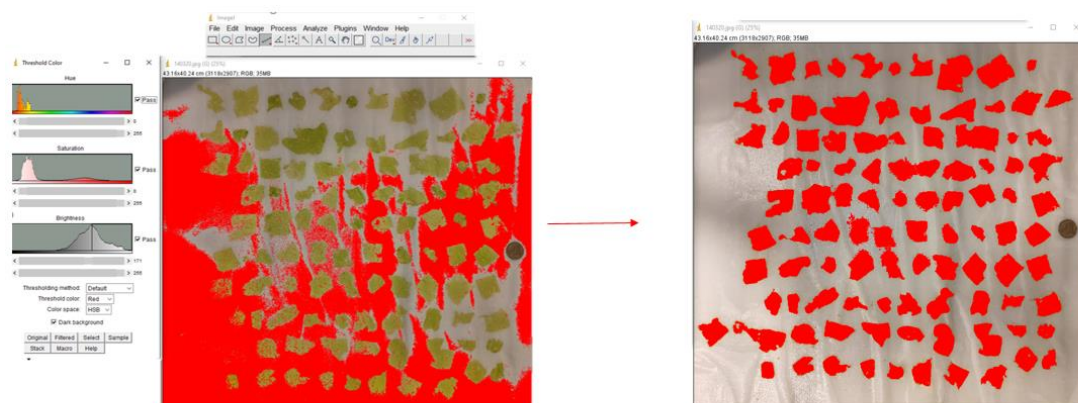
Image > Adjust > Color Threshold

En aquest cas s'obrirà una pestanya. En aquesta pestanya es podran seleccionar les àrees, de les quals es vol obtenir la mesura. Per realitzar aquesta selecció, hem d'anar variant el panell d'edició fins a trobar un punt en el qual tots els fragments d'alga quedin ombrejats de color vermell.

Una vegada diferenciats els fragments del fons s'han de seleccionar. Per fer aquesta selecció, es procedeix:

Analyze > Tools > ROI Manager





La pestanya que s'obre permet seleccionar els fragments d'alga, a més a més, es poden numerar amb una etiqueta. Una vegada seleccionats i afegits (Add (t)) tots els fragments a la llista, fem la mesura de l'àrea (Measure).



D'aquesta mesura obtindrem una taula com la següent, en la qual trobem l'àrea de cada fragment en cm.

	Area
1	3.165
2	8.070
3	2.385
4	2.715
5	4.656
6	1.392
7	3.824
8	11.081
9	9.219
10	1.015

# ANNEX B

---

## Anàlisi alcalinitat

## Annex B. Anàlisi alcalinitat

L'alcalinitat està descrita com la mesura de la capacitat de neutralització d'àcids de l'aigua i normalment es determina mitjançant la titulació contra l'àcid sulfúric fins al punt final de la reacció àcid base. La titulació és un mètode d'anàlisi químic quantitatiu per tal de determinar concentracions desconegudes d'un reactiu a partir d'un altre reactiu de concentració coneguda.

L'alcalinitat es causada per diversos motius, per exemple: reaccions d'intercanvi en els sòls, l'absorció biològica i la reducció d'anions forts, l'evaporació, precipitació de minerals, etc.

### Protocol de mesura:

#### - Material necessari:

- Erlenmeyer
- Vas de precipitats
- Bureta (10 ml)
- Ataronjat de metil amb comptagotes
- Pipeta
- HCl (0,02M)
- Aigua destil·lada

#### - Procediment:

1. Buidar en vas de precipitats mostra de l'aigua a estudiar.
2. Amb la pipeta, s'agafen 10 mL de la mostra del vas de precipitats i es traslladen a l'erlenmeyer.
3. S'introdueixen 3 gotes d'ataronjat de metil a l'erlenmeyer i mesquem, quedarà un color de groc intens.
4. Afegim HCl necessari a un vas de precipitats.
5. Introduïm el HCl (0,02M) del vas de precipitats a la bureta i enrasem a 0.
6. Anem afegint gota a gota de HCl de la bureta a l'Erlenmeyer ( que conté la mostra + 3 gotes d'ataronjat de metil). És important anar remouent l'Erlenmeyer, per tal d'homogeneïtzar la barreja.
7. En el moment, en què s'observi un canvi de color coure-granat, en caure la gota, s'ha d'aturar el procediment i remoure. Si una vegada remenat:
  - a) La solució de l'Erlenmeyer es torna de color groc (menys intens que a l'inici) continuem tirant gotes.
  - b) La gota de coure-granat, continua quedant com una taca en la superfície i no es reparteix uniformement per a la resta de volum continuem tirant gotes.
  - c) El volum de l'Erlenmeyer es torna de color coure-granat, parar de tirar gotes, procés finalitzat.
8. Anotar el valor total de HCl que s'ha introduït a la mostra.

En general, amb 3 repeticions és suficient per obtenir un valor fiable. Tot i això, si alguna de les 3 mesures dóna un valor significativament diferent de la resta, l'aconsellable és eliminar aquesta mesura i realitzar una quarta repetició.

Un cop es tenen els tres valors de les diferents mesures, hi ha dues opcions a realitzar:

1. Fer la mitjana dels volums de HCl consumits en cada repetició i utilitzar el valor mitjà en el càlcul de la concentració de carbonat de calci.
2. Calcular, les diferents concentracions de carbonat de calci, a partir dels tres valors de HCl consumits i fer la mitjana dels diferents valors de concentració obtinguts en el càlcul.

Tant una opció com l'altre haurien de donar el mateix si s'ha realitzat el càlcul correctament.

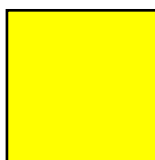
Càlcul de la concentració de carbonat de calci:

$$\frac{\text{Volum de HCl consumit} \cdot 100,0089}{2}$$

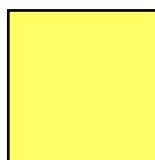
Aquesta fórmula és el resultat d'una sèrie més de factors de conversió, una vegada simplificats. Mitjançant aquest càlcul obtenim la quantitat de  $\text{CaCO}_3$  (mg  $\text{CaCO}_3$ / L de mostra), aquest valor determina l'alcalinitat de la mostra estudiada.

Rang de colors:

El rang de colors que s'ha de tenir en compte durant aquest procés és el següent:



Mostra  
+  
Ataronjat de Metil



Mostra  
+  
Ataronjat de Metil  
+  
HCl (valor insuficient)



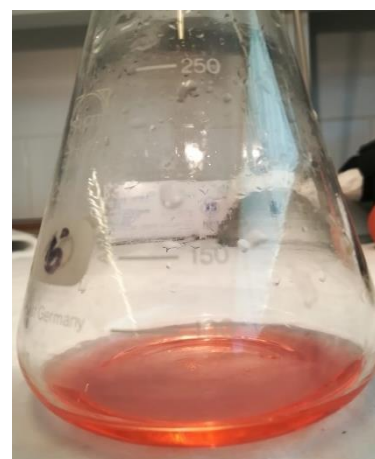
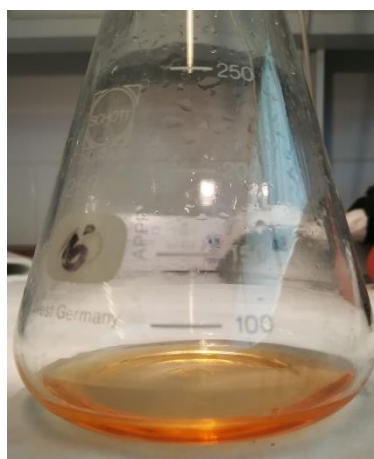
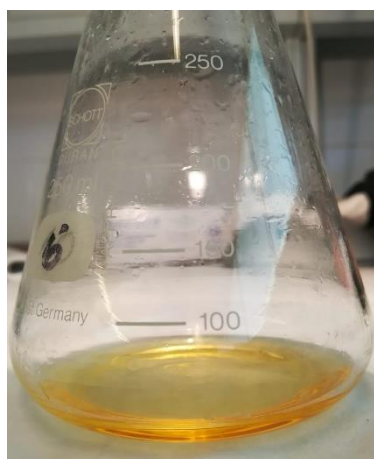
Mostra  
+  
Ataronjat de Metil  
+  
HCl (valor correcte)



Mostra  
+  
Ataronjat de Metil  
+  
HCl (Volum consumit excessiu)



MESURA INCORRECTE



Com podem observar la diferència de colors és força clara. Cal tenir en compte que el canvi de tonalitat entre el groc i el coure és molt ràpid, i de seguida es canvia a rosa-granat.

# ANNEX C

---

## Anàlisi de nitrats



## Annex C. Anàlisi de nitrats

El mètode descrit es basa en la mesura de l'absorció a l'UV de l'ió nitrat a 220nm. És adequat com a mètode de screening en mostres d'aigües naturals no contaminades. L'absorció de matèria orgànica dissolta es corregeix amb la mesura a 275nm. L'ió clorur no afecta la determinació. El medi àcid prevé la possible interferència d'hidròxid o carbonat.

### Protocol de mesura:

#### - Material necessari:

##### Instrumental i material

- Espectrofotòmetre a llum d'UV
- Xeringues de 10-15mL amb filtres de membrana, diàmetre de porus de 0,45µm
- Matrassos aforats de 50ml
- Pipetes de 1, 2, 5, 10, 20 i 25ml
- Aigua desionitzada

##### Reactius

- Solució mare de nitrats de 100 mg/L N-NO<sub>3</sub>. Dissoldre 0,7218 g de KNO<sub>3</sub> (assecat 1h en estufa a 105 °C) en un litre d'aigua desionitzada.
- Solució intermèdia de 10 mg/L N-NO<sub>3</sub>. Es prepara per dilució 1/10 a partir de la solució mare. Es congela en gots de 100 ml.
- Àcid clorhídric 1M. 41,22 ml de HCl concentrat (37% i 1,19 g/ml) diluït fins a 500 ml amb aigua desionitzada.

#### - Procediment:

### Preparació dels patrons

- Patró de 0,2 mg N-NO<sub>3</sub>/L : Pipetejar 1ml de la solució intermèdia de 10 mg de N-NO<sub>3</sub>/L en un matràs aforat de 50 ml i enrasar amb aigua desionitzada.
- Patró de 0,4 mg N-NO<sub>3</sub>/L : Pipetejar 2ml de la solució intermèdia de 10 mg de N-NO<sub>3</sub>/L en un matràs aforat de 50 ml i enrasar amb aigua desionitzada.
- Patró de 0,8 mg N-NO<sub>3</sub>/L : Pipetejar 4ml de la solució intermèdia de 10 mg de N-NO<sub>3</sub>/L en un matràs aforat de 50 ml i enrasar amb aigua desionitzada.
- Patró d'1 mg N-NO<sub>3</sub>/L : Pipetejar 5ml de la solució intermèdia de 10 mg de N-NO<sub>3</sub>/L en un matràs aforat de 50 ml i enrasar amb aigua desionitzada.
- Patró de 2 mg N-NO<sub>3</sub>/L : Pipetejar 10ml de la solució intermèdia de 10 mg de N-NO<sub>3</sub>/L en un matràs aforat de 50 ml i enrasar amb aigua desionitzada.
- Patró de 4 mg N-NO<sub>3</sub>/L : Pipetejar 20ml de la solució intermèdia de 10 mg de N-NO<sub>3</sub>/L en un matràs aforat de 50 ml i enrasar amb aigua desionitzada.
- Patró de 5 mg N-NO<sub>3</sub>/L : Pipetejar 25ml de la solució intermèdia de 10 mg de N-NO<sub>3</sub>/L en un matràs aforat de 50 ml i enrasar amb aigua desionitzada.
- Patró de 7 mg N-NO<sub>3</sub>/L : Pipetejar 35ml de la solució intermèdia de 10 mg de N-NO<sub>3</sub>/L en un matràs aforat de 50 ml i enrasar amb aigua desionitzada.

- Afegir a cada patró 1ml de HCl 1M.

### Preparació de les mostres

- Filtrar la mostra per un filtre de membrana amb un diàmetre de porus de 0,45µm.
- Diluir si la concentració prevista és superior a 5mg N-NO<sub>3</sub>/L: Pipetejar un volum v ml en un matràs aforat de 50ml i enrasar amb aigua desionitzada.
- Afegir 1ml de HCl 1M.

### Lectura de patrons i mostres

- Fixar les longituds d'ona a l'espectrofotòmetre: 220 nm i 275 nm.
- Ajustar el zero d'absorbància amb aigua desionitzada.
- Llegir per duplicat els patrons preparats anteriorment.
- Llegir per triplicat les mostres preparades anteriorment.

### Càlculs:

- **Dades**

Lectura dels patrons a  $\lambda=220\text{nm}$  i  $\lambda=275\text{nm}$

Lectura de les mostres a  $\lambda=220\text{nm}$  i  $\lambda=275\text{nm}$

v= mL de mostra diluïts en 50mL

- **Recta de calibració**

Obtenir l'equació i el valor de R<sup>2</sup> de la recta de regressió a partir de:

Abcisses: valors de concentració 0, 0,2, 0,4, 0,8, 1, 2, 4, 5 i 7 mg N-NO<sub>3</sub>/L

Ordenades: valors d'Absorbància corresponents, obtinguts mitjançant la següent equació:

$$\text{Absorbància nitrat} = \text{Lectura } \lambda(220\text{nm}) - 2 \cdot \text{Lectura } \lambda(275\text{nm})$$

- **Resultats**

Calcular el valor d'Absorbància de les mostres a partir dels valors de lectura d'acord amb l'equació

$$\text{Absorbància nitrat} = \text{Lectura } \lambda(220\text{nm}) - 2 \cdot \text{Lectura } \lambda(275\text{nm})$$

Portar el valor d'Absorbància calculada a la recta de regressió i deduir el valor de la concentració en mg N-NO<sub>3</sub>/L.

Si s'ha fet dilució, aplicar el factor:

$$\frac{\text{mg N} - \text{NO}_3^-}{L \text{ dilució}} \cdot \frac{50 \text{ mL dilució}}{v \text{ mL mostra}} \cdot \frac{\text{mg N} - \text{NO}_3^-}{L \text{ mostra}}$$

# ANNEX D

---

## Taules resultats ImageJ

## Annex D. Taules resultats ImageJ

Taula 1 Resultats ImageJ primer cultiu

Índex	Àrea (cm²) 21/02/2020	Àrea (cm²) 28/02/2020	Àrea (cm²) 06/03/2020	Àrea (cm²) 14/03/2020
1	0.366	0.171	3.817	4.055
2	0.354	0.701	2.461	8.178
3	0.328	0.519	1.459	2.289
4	0.391	0.879	0.839	2.598
5	0.464	1.064	0.729	4.881
6	0.297	0.286	1.763	1.320
7	0.302	0.328	1.574	3.942
8	0.217	0.393	3.927	10.759
9	0.440	0.350	1.232	8.997
10	0.386	0.901	0.483	1.063
11	0.373	0.638	1.330	3.842
12	0.452	1.408	3.265	1.950
13	0.375	0.871	3.590	6.301
14	0.371	0.668	2.151	11.925
15	0.788	0.967	1.044	4.006
16	0.353	0.291	0.699	3.319
17	0.269	0.202	1.666	5.304
18	0.282	0.800	0.978	2.004
19	0.248	0.521	1.775	5.959
20	0.275	0.556	0.902	3.575
21	0.375	0.538	2.559	5.210
22	0.351	0.542	1.749	3.156

23	1.344	0.384	1.398	5.061
24	0.425	0.516	0.546	4.221
25	0.488	0.863	2.516	5.265
26	0.357	0.425	0.934	1.257
27	1.110	0.681	1.544	3.908
28	0.258	0.416	1.992	9.759
29	0.228	0.444	0.508	0.957
30	0.571	0.391	0.726	2.938
31	0.178	0.542	1.514	4.694
32	0.348	1.244	0.865	1.373
33	0.556	0.602	1.614	2.200
34	0.404	0.535	0.483	3.065
35	0.286	1.575	0.907	2.616
36	0.455	0.354	0.486	2.832
37	0.478	0.393	2.355	4.902
38	0.328	0.670	0.951	1.481
39	0.518	0.509	1.396	2.496
40	0.239	0.535	1.225	5.710
41	0.310	1.029	2.816	6.624
42	0.294	0.535	1.962	7.444
43	0.168	0.752	0.587	3.424
44	0.309	0.922	1.135	2.557
45	0.230	0.973	2.087	1.420
46	0.400	0.316	2.015	3.181
47	0.212	0.469	0.587	3.239
48	0.488	0.470	2.900	4.242

49	0.279	0.649	0.769	1.635
50	0.162	0.580	1.907	5.508
51	0.196	0.756	0.669	5.652
52	0.381	0.918	0.953	2.629
53	0.327	0.577	1.294	3.788
54	0.428	0.697	1.376	3.818
55	0.243	0.685	1.345	3.374
56	0.247	0.459	0.736	3.729
57	0.645	0.727	0.467	2.237
58	0.167	0.267	0.859	1.371
59	0.459	0.594	0.782	4.451
60	0.276	0.415	1.641	4.408
61	0.808	1.096	0.754	5.855
62	0.373	1.152	0.505	4.752
63	0.512	1.322	1.222	4.752
64	0.615	0.776	0.363	1.752
65	0.410	0.450	0.867	5.240
66	0.290	0.589	1.243	3.551
67	0.324	0.592	1.583	2.444
68	0.295	1.239	0.912	4.586
69	0.290	0.633	0.898	5.126
70	0.306	0.541	1.364	6.467
71	0.322	1.217	0.841	5.233
72	0.456	0.422	0.796	3.204
73	0.351	0.694	1.229	2.203
74	0.510	1.153	2.268	4.660



75	0.355	0.382	1.560	2.223
76	0.310	0.478	0.455	1.681
77	0.324	0.529	1.497	3.827
78	0.248	0.416	0.596	5.224
79	0.315	0.444	1.733	4.084
80	0.478	0.892	1.292	2.766
81	0.298	0.225	1.312	5.620
82	0.380	0.647	2.977	5.464
83	0.677	0.478	2.883	8.756
84	0.440	0.813	0.770	4.898
85	0.210	0.341	1.377	4.664
86	0.247	0.237	1.887	4.803
87	0.313	0.420	0.696	3.514
88	0.318	0.481	0.958	6.277
89	0.481	0.447	0.775	7.340
90	0.182	0.471	1.292	2.094
91	0.353	0.568	1.209	2.363
92	0.307	0.371	0.475	2.370
93	0.477	1.092	1.353	3.370
94	0.434	1.484	0.834	3.853
95	0.434	0.684	0.672	2.657
96	0.466	0.271	0.609	2.377
97	0.690	0.336	1.043	4.665
98	0.242	0.459	3.817	4.483
99	-	0.534	-	4.633
100	-	-	-	4.780

101	-	-	-	2.568
-----	---	---	---	-------

Taula 8 Resultats ImageJ segon cultiu

Índex	Àrea (cm <sup>2</sup> ) 15/06/2020	Àrea (cm <sup>2</sup> ) 22/06/2020	Àrea (cm <sup>2</sup> ) 29/06/2020
1	0.385	0.783	0.689
2	0.407	0.558	0.414
3	0.484	0.405	0.370
4	0.496	0.450	0.592
5	0.375	0.944	0.422
6	0.475	0.741	0.576
7	0.407	0.577	0.818
8	0.395	0.741	0.613
9	0.403	0.682	0.620
10	0.418	0.604	0.639
11	0.384	0.672	0.743
12	0.449	0.547	0.280
13	0.464	0.499	0.514
14	0.454	0.407	0.692
15	0.47	0.844	0.499
16	0.453	0.942	0.521
17	0.468	1.003	0.436
18	0.442	0.941	0.421
19	0.415	0.419	0.512
20	0.61	0.624	0.640
21	0.415	0.825	0.753

22	0.431	0.518	0.999
23	0.421	0.911	0.556
24	0.447	0.716	0.629
25	0.498	0.500	0.435
26	0.531	1.576	0.560
27	0.467	0.888	0.816
28	0.413	0.733	0.403
29	0.527	0.789	0.452
30	0.55	0.494	0.697
31	0.473	1.011	1.147
32	0.412	1.490	0.809
33	0.429	0.645	0.496
34	0.466	0.551	0.536
35	0.399	0.642	0.623
36	0.432	0.802	0.473
37	0.449	1.860	0.733
38	0.431	1.023	0.738
39	0.33	0.675	0.365
40	0.507	1.498	0.473
41	0.385	0.799	0.610
42	0.388	0.939	0.759
43	0.438	0.375	0.542
44	0.437	0.744	0.348
45	0.437	0.543	0.388
46	0.361	0.845	0.189
47	0.416	0.731	0.364

48	0.554	0.822	0.463
49	0.427	0.822	0.500
50	0.583	0.649	0.785
51	0.43	0.822	0.538
52	0.389	1.037	0.835
53	0.422	0.574	0.637
54	0.462	0.513	0.379
55	0.432	0.788	0.404
56	0.415	0.212	0.473
57	0.434	1.350	0.500
58	0.457	0.595	0.441
59	0.471	0.699	0.501
60	0.597	0.582	0.753
61	0.44	0.515	0.851
62	0.456	0.427	0.700
63	0.478	0.480	0.632
64	0.456	0.578	0.783
65	0.435	0.605	0.570
66	0.405	0.907	0.465
67	0.481	0.506	0.719
68	0.429	1.081	0.409
69	0.494	0.546	0.603
70	0.549	0.785	0.514
71	0.47	0.752	0.511
72	0.411	0.488	0.633
73	0.442	0.470	0.824

74	0.439	0.364	0.600
75	0.436	0.581	0.698
76	0.459	0.804	0.573
77	0.48	0.662	0.904
78	0.455	0.553	0.511
79	0.497	0.648	0.787
80	0.543	0.627	0.480
81	0.477	0.623	0.898
82	0.471	0.446	0.488
83	0.404	0.593	0.547
84	0.422	0.560	0.837
85	0.448	0.861	0.645
86	0.432	0.551	0.587
87	0.406	0.514	0.614
88	0.46	0.840	0.657
89	0.456	0.946	0.726
90	0.607	0.603	0.546
91	0.465	0.770	0.657
92	0.416	0.601	0.761
93	0.441	0.514	0.616
94	0.452	0.717	0.598
95	0.453	0.633	0.830
96	0.44	0.919	0.577
97	0.436	0.870	0.536
98	0.506	0.573	0.505
99	0.433	0.607	0.751

100	0.592	0.575	0.242
101		0.839	

*Taula 9 Resultats ImageJ tercer cultiu*

Índex	Àrea (cm <sup>2</sup> ) 29/06/2020	Àrea (cm <sup>2</sup> ) 06/07/2020
1	0.404	0.469
2	0.42	0.558
3	0.422	0.464
4	0.381	0.522
5	0.343	0.435
6	0.447	0.639
7	0.365	1.096
8	0.41	0.749
9	0.366	0.315
10	0.408	0.098
11	0.401	0.495
12	0.371	0.496
13	0.397	0.519
14	0.348	0.508
15	0.39	0.493
16	0.358	0.518
17	0.369	0.598
18	0.363	0.579
19	0.392	0.377
20	0.376	0.327

21	0.411	0.483
22	0.356	0.426
23	0.383	0.510
24	0.353	0.483
25	0.363	0.616
26	0.36	0.686
27	0.375	0.574
28	0.439	0.574
29	0.395	0.571
30	0.408	0.180
31	0.37	0.541
32	0.432	0.498
33	0.357	0.506
34	0.351	0.437
35	0.379	0.444
36	0.383	0.148
37	0.392	0.500
38	0.344	0.658
39	0.391	0.598
40	0.414	0.471
41	0.356	0.708
42	0.414	0.530
43	0.374	0.533
44	0.367	0.530
45	0.381	0.440
46	0.378	0.516



47	0.4	0.435
48	0.39	0.486
49	0.392	0.515
50	0.397	0.518
51	0.393	0.501
52	0.377	0.439
53	0.388	0.436
54	0.346	0.517
55	0.371	0.538
56	0.356	0.977
57	0.342	0.685
58	0.394	0.840
59	0.478	0.502
60	0.417	0.502
61	0.368	0.879
62	0.327	0.524
63	0.342	0.953
64	0.386	0.775
65	0.362	0.605
66	0.34	0.578
67	0.397	0.540
68	0.428	0.668
69	0.335	0.489
70	0.381	0.421
71	0.355	0.529
72	0.370	0.472

73	0.403	0.455
74	0.348	0.597
75	0.387	0.597
76	0.343	0.613
77	0.424	0.231
78	0.355	0.127
79	0.455	0.576
80	0.415	0.441
81	0.421	0.100
82	0.314	0.518
83	0.325	0.728
84	0.382	0.335
85	0.395	0.520
86	0.264	0.505
87	0.358	0.505
88	0.375	0.566
89	0.348	0.592
90	0.336	0.127
91	0.344	0.482
92	0.391	0.278
93	0.353	0.063
94	0.37	0.484
95	0.41	0.528
96	0.369	0.609
97	0.366	0.611
98	0.361	0.040

99	0.324	0.557
100		0.579

# ANNEX E

---

## Diagrama experimental

## Annex E. Diagrama experimental

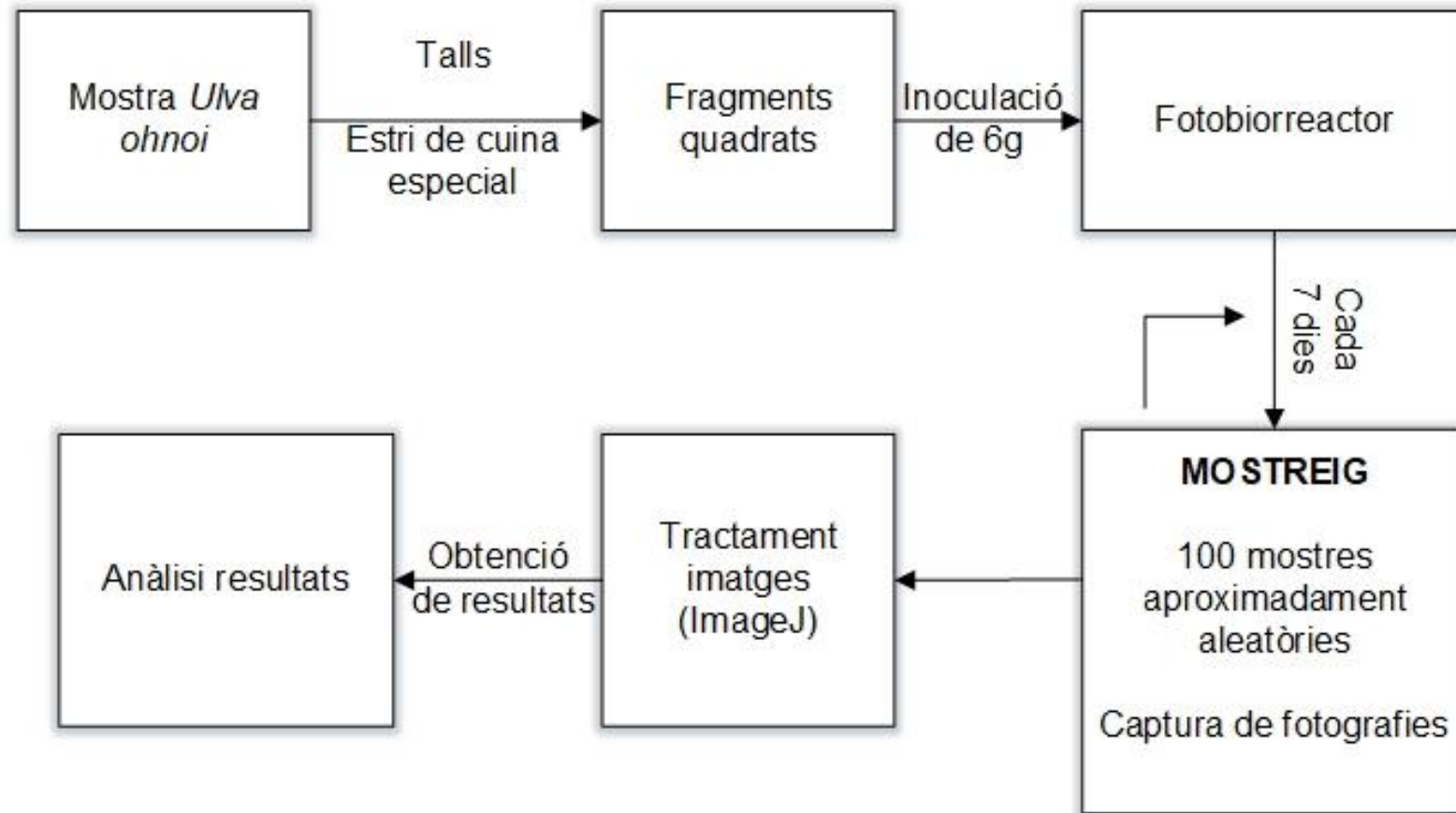


Fig 1 Diagrama experimental (Realitzat per Nicole Lima Fermin, ESAB, UPC, 2020)

# ANNEX F

---

## Dades experimentals dels paràmetres ambientals del fotobiorreactor

## Annex F. Dades experimentals dels paràmetres ambientals del fotobiorreactor

Taula 2 Valors paràmetres ambientals fotobiorreactor

	Dia	Temperatura (°C)	O <sub>2</sub> (mg/l)	Saturació (%)	pH	Salinitat (ppt)	Alcalinitat (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	Observacions
primer cultiu	03/03/2020	24.1	7.9	105	9.38	27.3	-	Llums ON
	04/03/2020	-	-	-	-	-	127.51	
	06/03/2020	23.3	8.6	111	9.5	40.2	-	Llums ON
	09/03/2020	24.2	9	116	8.8	-		Llums ON (+300 ml HCl)
	10/03/2020	21.6	12.4	108	9.23	37	69.17	Llums ON, +30 ml HCl, +4g bicarbonat
	11/03/2020	23.5	9	106	8.89	-	125.01	Llums ON, +30 ml HCl
	12/03/2020	27	9	90	-	-	-	Sensor molt variant.
segon cultiu	15/06/2020	23.9	8.7	103	7.98	35		Llums ON
	16/06/2020	24	8.7	104	8.05	36		Llums OFF
	17/06/2020	-	-	-	-			Llums OFF
	18/06/2020	24.1	8.6	102	8.17	38		Llums OFF
	19/06/2020	23.9	8.4	99	8.15	35		Llums OFF
	20/06/2020	-	-	-	-			
	21/06/2020	-	-	-	-			
	22/06/2020	25.4	8.9	103	7.94			Llums OFF
	23/06/2020	-	-	-	8.06		130.01	
	24/06/2020	26.3	7.3	128	8.1		117	Llums OFF
	26/06/2020	25.9	6.8	100	8.87			Llums OFF
	26/06/2020	29.8	6.5	103	8.85			Llums ON
	29/06/2020	24.9	6.1	89	8.53		117.51	Llums OFF



tercer cultiu	30/06/2020	25.9	6.6	99	8.41			Llums OFF
	01/07/2020	30.6	6.5	104	7.84	40	132.51	Llums ON
	02/07/2020	26.4	6.9	103	8.18			Llums OFF
	03/07/2020	27.7	6.7	101	8.53			Llums ON
	04/07/2020							
	05/07/2020							
	06/07/2020	27.1	6.2	93	8.63	40		Llums OFF

# ANNEX G

---

## Dades experimentals determinació clorofil·la

## Annex F. Dades experimentals determinació clorofil·la

*Taula 10 Dades experimentals determinació clorofil·les, corresponents al segon i tercer cultiu, i a les algues inicials provinents del tanc N2.*

Fragment	CCI Cultiu 2	CCI Cultiu 3	CCI tanc N2	Concentració de clorofil·la segon cultiu ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ )	Concentració de clorofil·la tercer cultiu ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ )	Concentració de clorofil·la total tanc N2 ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ )
1	1.1	1.2	2.6	15.0	21.6	114.8
2	1.2	1.1	2.3	21.6	15.0	94.8
3	1.2	1.2	2.3	21.6	21.6	94.8
4	1.3	1.2	2.8	28.3	21.6	128.1
5	1.2	1.1	3.0	21.6	15.0	141.4
6	1.4	1.2	2.1	35.0	21.6	81.5
7	1.2	1.2	2.3	21.6	21.6	94.8
8	1.4	1.1	2.2	35.0	15.0	88.2
9	1.2	1.1	1.9	21.6	15.0	68.2
10	1.2	1.1	2.0	21.6	15.0	74.9
11	1.2	1.2	2.2	21.6	21.6	88.2
12	1.2	1.0	2.1	21.6	8.3	81.5
13	1.4	1.2	2.3	35.0	21.6	94.8
14	1.4	1.1	1.3	35.0	15.0	28.3
15	1.5	1.2	2.1	41.6	21.6	81.5
16	1.3	1.2	2.2	28.3	21.6	88.2
17	1.4	1.1	2.2	35.0	15.0	88.2
18	1.2	1.2	2.0	21.6	21.6	74.9
19	1.3	1.1	2.3	28.3	15.0	94.8
20	1.5	1.2	2.3	41.6	21.6	94.8

21	1.2	1.2	2.4	21.6	21.6	101.5
22	1.1	1.1	2.0	15.0	15.0	74.9
23	1.2	1.1	2.1	21.6	15.0	81.5
24	1.2	1.2	2.2	21.6	21.6	88.2
25	1.2	1.1	2.1	21.6	15.0	81.5
26	1.2	1.2	3.1	21.6	21.6	148.1
27	1.4	1.2	2.1	35.0	21.6	81.5
28	1.2	1.1	1.9	21.6	15.0	68.2
29	1.4	1.1	2.1	35.0	15.0	81.5
30	1.6	1.1	2.1	48.3	15.0	81.5
31	1.4	1.2	2.2	35.0	21.6	88.2
32		1.1	2.1		15.0	81.5